

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平6-500239

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)1月13日

(51)Int.Cl.³ 譲別記号 庁内整理番号 F I
C 12 N 15/53
A 01 H 5/00 A 8502-2B
C 12 N 9/02 9359-4B
15/82

審査請求 有 予備審査請求 未請求(全29頁)

(21)出願番号 特願平5-501846
(86) (22)出願日 平成4年(1992)7月8日
(85)翻訳文提出日 平成5年(1993)3月10日
(86)国際出願番号 PCT/AU92/00334
(87)国際公開番号 WO93/01290
(87)国際公開日 平成5年(1993)1月21日
(31)優先権主張番号 PK7173
(32)優先日 1991年7月11日
(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)
(31)優先権主張番号 PL0923
(32)優先日 1992年2月17日
(33)優先権主張国 オーストラリア(AU)

(71)出願人 インターナショナル フラワー ディベロ
ブメンツ プロプライタリー リミティ
ド
オーストラリア国, ビクトリア 3066, コ
リングウッド, ギップス ストリート 16
(72)発明者 ホルトン, テイモシー アルバート
オーストラリア国, ビクトリア 3070, ノ
ースコート, オールディス アベニュー19,
ユニット 1
(74)代理人 弁理士 宇井 正一 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 フラボノイド経路の酵素をコードする遺伝子配列及びその使用

(57)【要約】

本発明は、ジヒドロカンフェロール(DHK)ヒドロキシル化酵素又はその誘導体もしくは部分をコードするか、又はそれをコードする配列に相補的なヌクレオチド配列を含んで成る核酸単離体に関する。本発明はまた、前記核酸材料を有し、かつ発現するトランスジェニック植物に関する。

請求の範囲

1. ジヒドロカンフェロール (dihydrokaempferol:DHK)ヒドロキシル化酵素又はその誘導体もしくは部分をコードするか、又はこれをコードする配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んで成る核酸单離体。
2. 前記核酸がDNA又はcDNAである、請求項1に記載の核酸单離体。
3. 前記酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項1又は2に記載の核酸单離体。
4. 前記酵素がペチュニア、バーベナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー又はナス由来である請求項1～3のいずれか1項に記載の核酸单離体。
5. 前記酵素がペチュニア由来である、請求項4に記載の核酸单離体。
6. 図9又は10に記載されているか又はそれに対して少なくとも40%の類似性を有するヌクレオチド配列の実質的にすべて又は部分を含んで成る核酸配列を有する、請求項4又は5に記載の核酸单離体。
7. トランスジェニック植物に存在する場合の請求項1～6のいずれか1項に記載の核酸单離体。
8. 前記トランスジェニック植物がバラ、ペチュニア、キク、カーネーション、ガーベラ、ゼラニウム又はユリズイセンである、請求項7に記載の核酸单離体。
9. トランスジェニック植物がバラ又はペチュニアである請求項8記載の核酸单離体。
10. 核酸单離体を植物細胞又は組織に移行させることができるべ

クター分子中に含まれる、請求項1～9のいずれか1項に記載の核酸单離体。

11. 前記移行がアグロバクテリウム (*Agrobacterium*)との共存培養を必要とする、請求項10に記載の核酸单離体。
12. 前記ベクター及び核酸单離体が図11に示すpCCP90である、請求項10又は11に記載の核酸单離体。
13. 組換えジヒドロカンフェロール (DHK)ヒドロキシル化酵素又はその誘導体もしくは部分。
14. 前記酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項13に記載の組換え酵素。
15. 前記酵素がペチュニア、バーベナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー及びナス由来である、請求項13又は14に記載の組換え酵素。
16. 前記酵素がペチュニア由来である、請求項15に記載の組換え酵素。
17. 図9又は10に記載の又はそれに対して少なくとも40%の類似性を有するアミノ酸配列の実質的にすべて又は部分を含んでなるアミノ酸配列を有する、請求項15又は16に記載の組換え酵素。
18. トランスジェニック植物中に存在する場合の請求項13～17のいずれか1項に記載の組換え酵素。
19. 前記トランスジェニック植物がバラ、ペチュニア、キク、カーネーション又はガーベラである、請求項18に記載の組換え酵素。
20. 前記トランスジェニック植物がバラ又はペチュニアである、請求項19に記載の組換え酵素。
21. 組換えジヒドロカンフェロール (DHK)ヒドロキシル化酵素を発現することができるか、又はDHKヒドロキシル化酵素に翻訳できるmRNA分子の全部もしくは部分に実質的に相補的な核酸配列の転写

- を指令するトランスジェニック植物の製造方法であって、請求項1又は6に記載の核酸单離体を該核酸单離体の最終的発現を可能にする条件下に適当な植物の細胞に導入し、該細胞からトランスジェニック植物を再生し、そして該トランスジェニック植物を前記核酸单離体の発現を可能にするのに十分な時間及び条件下で成長せしめる、ことを含んで成る方法。
22. 前記組換え酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項21に記載の方法。
 23. 前記核酸单離体の発現が発生段階により制限される、請求項21又は22に記載の方法。
 24. 前記組換え酵素がペチュニア、バーベナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー又はナス由来のものである、請求項23に記載の方法。
 25. 前記組換え酵素がペチュニア由来のものである、請求項26に記載の方法。
 26. 前記核酸单離体又は酵素が図9又は図10に記載されているのと実質的に同じか又はそれに対して少なくとも40%の類似性を有するヌクレオチド配列又はアミノ酸配列を有する、請求項23又は24に記載の方法。
 27. 前記トランスジェニック植物がバラ、ペチュニア、キク、カーネーション、ガーベラ又はタバコである、請求項21～26のいずれか1項に記載の方法。
 28. 前記トランスジェニック植物がバラ又はペチュニアである、請求項27に記載の方法。
 29. ジヒドロカンフェロール (DHK)ヒドロキシル化酵素をコードするか、又はそれをコードする配列に相補的なヌクレオチド配列を含んで成る安定に導入された核酸分子を有するトランスジェニック

植物。

30. 前記酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項29に記載のトランスジェニック植物。
31. 前記酵素がペチュニア、バーベナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー又はナス由来である、請求項30に記載のトランスジェニック植物。
32. 前記酵素がペチュニア由来のものである、請求項31に記載のトランスジェニック植物。
33. 前記酵素が図9又は2に記載のものと実質的に同じかあるいはそれに対して少なくとも40%の類似性を有するアミノ酸配列を有する、請求項31又は32に記載のトランスジェニック植物。
34. 前記植物がバラ、ペチュニア、キク、カーネーション、ガーベラ、アイリス、チューリップ、ユリ、リシアンサス(*Lisianthus*)、フリージア、ヒエンソウ、リムニウム(*Limonium*)又はペラルゴニウムである、請求項29～32のいずれか1項に記載のトランスジェニック植物。
35. 前記トランスジェニック植物がバラ又はペチュニアである、請求項34に記載のトランスジェニック植物。
36. 植物からのシトクロムP450分子又は類似分子をコードするか又はそれをコードする配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子をクローニングする方法であって、1又は複数のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて1又は複数のポリメラーゼ連鎖反応により前記植物の細胞からの核酸分子の適切な調製物からシトクロムP450ヌクレオチド配列又は相補的配列を増幅することを含んで成り、前記プライマーが既知のミクロソーム由来シトクロムP450分子の1又は複数のコンセンサス配列に由来するヌクレオチド配列を有するものである、前記方法。

明細書

37. 前記コンセンサス配列がシトクロムP450分子のヘム結合ドメインからのものである、請求項36に記載の方法。

38. 前記コンセンサス配列がF(G,S)XGXRXCXGであり、ここでXは任意のアミノ酸である、請求項37に記載の方法。

39. 前記コンセンサス配列がFWPGAGRXCLGであり、ここでXが任意のアミノ酸である、請求項37に記載の方法。

40. 前記シトクロムP450分子又は類似分子がDHKヒドロキシル化酵素である、請求項36～39のいずれか1項に記載の方法。

41. 前記DHKヒドロキシル化酵素が3', 5'-ヒドロキシラーゼである、請求項40に記載の方法。

42. 前記クローン化された酵素が図9又は10に示すのと実質的に同じかあるいはそれに対して少なくとも40%の類似性を有するアミノ酸配列、又はヌクレオチド配列によりコードされているアミノ酸配列を有する、請求項40又は41に記載の方法。

フラボノイド経路の酵素をコードする遺伝子配列及びその使用

本発明は一般にフラボノイド経路代謝酵素をコードする遺伝子配列並びに植物及び他の生物体における色素形成の操作におけるごときその使用に関する。

花類産業は開花植物の新規且つ種々の品種を開発することに努力している。この様な新規な品種を創成するための有効な方法は花の色の操作を通してであり、そして古典的な育種技法を用いて、花類のほとんどの商業的品種について広範囲な色を生成することに幾分成功している。しかしながら、この方法は、特定の種の遺伝子ブルの束縛により制限され、そしてこの理由のため単一の種が広範囲の種類の着色品種を有することはまれである。確かに、青色花の入手可能性が制限されているために、1988年にオランダにおけるオークションで売られた青色の切花は5%未満であった。12種類の最もよく売られている花の内、アイリスとフリージアのみが青色の品種を提供しており、そしてこれらの品種が占める割合は全販売花の4%未満である。主要な切花用種、例えばバラ、菊、カーネーション及びガーベラの青色品種の開発は、切花市場及び緑賞市場の両者においてかなりの機会を提供するであろう。

花の色は主として2つのタイプの色素、すなわちフラボノイド及びカロチノイドに基く。フラボノイドは黄色から赤ないし青色の範囲に寄与する。カロチノイドはオレンジ又は黄の色調に寄与し、そして一般に黄色又はオレンジ色の花の唯一の色素である。花の色に主たる寄与をするフラボノイド分子は、シアニジン、デルフィニジン、ペチュニジン、ペオニジン、マルビジン及びベラルゴニジンの

グリコシル化誘導体であるアントシアントンである。異なるアントシアントンが色の顕著な変化を生成することができる。花の色はまた無色のフラボノイドの補助発色(co-pigmentation)、金属錯体形成、グリコシル化、アシル化、メチル化及び液胞のpHにより影響される (Porkmann 1991)。

フラボノイド色素のための生合成経路(以後、「フラボノイド経路」と称する)はよく確立されており、そして図1に示される(Ebel及びHahlbrock, 1988; Hahlbrock and Grisebach, 1979; Wiering and de Ulaming, 1984; Schramら、1984; Stafford, 1990)。この経路の第一の必須の段階は3分子のマロニル-CoAと1分子のp-クマロイル-CoAとの縮合を含む。この反応はカルコン合成酵素(chalcone synthase; CHS)により触媒される。この反応の生成物である2', 4', 4', 6'-テトラヒドロキシカルコンは通常、カルコン・フラバノン・イソメラーゼ(CHI)酵素により急速に異性化され、ナリンゲニンを生成する。次に、ナリンゲニンはフラバノン3-ヒドロキシラーゼ(P3H)により中央環の3位においてヒドロキシル化されジヒドロケンフェロール(dihydrokaempferol; DHK)を生成する。

ジヒドロチンフェロールのB環は3'位、又は3'位及び5'位の両方にいてヒドロキシ化されて、それぞれジヒドロケルセチン(dihydroquercetin; DHQ)及びジヒドロミリセチン(dihydromyricetin; DHM)を生成することができる。この経路に関与する2つの必須の酵素はフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ(以後、3', 5'-ヒドロキシラーゼと称する)及びフラボノイド3', 5'-ヒドロキシラーゼ(以後、3', 5'-ヒドロキシラーゼと称する)である。3', 5'-ヒドロキシラーゼはヒドロキシル化を触媒する広範囲酵素であって、ナリンゲニン及びDHKの3'及び5'位並びにエリオジクチオール及びDHQの5'位(Stoltz及び

Porkmann, 1982)のヒドロキシル化を触媒し、それぞれベンタヒドロキシフラバノン及びDHMを生成する。B環のヒドロキシル化のパターンが花弁の色の決定において必須の役割を演ずる。

ミクロソーム抽出物中のフラボノイド3', 5'-ヒドロキシ化はNADPH及びO₂並びにナリンゲニン又はDHKのいずれかを必要とする。バセリの細胞培養物の細胞培養物の酵素がよく研究されている(Hagmannら、1983)。一酸化炭素、シトクロムc及びNADP⁺による阻害が示すところによれば、この酵素はシトクロムP450関連酵素である。類似の酵素、活性がトウモロコシにおいて証明されている(Larson及びBussard, 1986)。3', 5'-ヒドロキシラーゼもまたシトクロムP450クラスの酵素である。シトクロムP450酵素は自然界に広く分布しており、そして脊椎動物、酵母、菌類、細菌及び1種の植物において特性決定されている。少なくとも154のシトクロムP450遺伝子の配列が決定されており、そしてこれらの遺伝子は27の異なる遺伝子ファミリーに類別されている(Nebertら、1991)。1つのファミリー内においてP450蛋白質配列は一般に40%以上の同一性を有するが、同一のサブファミリー内では46%以上の同一性が存在する(Nebertら、1991)。

植物において3'もししくは3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性又はフラボノイド経路に含まれる他の酵素を制御する可能性は、花弁の花を操作しそれによって單一種が広範囲の花色を発現することを可能にする手段を提供するであろう。本発明に従って、3', 5'-ヒドロキシラーゼのごときフラボノイド経路の酵素をコードする遺伝子配列が同定されそしてクローン化された。これらの組換え配列はDHK代謝並びにDHQ、ナリンゲニン及びエリオディクチオール(eriodictyol)のごとき他の基質の代謝の調節を可能にし、それによりアントシアントンのヒドロキシル化パターンを決定しそして花弁の

色を操作する手段を提供することを可能にする。しかしながら本発明は、花類のみならず、果実及び野菜植物並びに例えば糧食用植物の葉に拡張される。

従って、本発明の1つの観点は、ジヒドロカンフェロール(dihydrokaempferol; DHK)ヒドロキシル化酵素をコードするヌクレオチドの配列又はそれをコードする配列に相補的な配列を含んで成る核酸单離体、あるいはその誘導体又は部分を提供する。

単に便宜上及び手短かな表記により、「DHK ヒドロキシル化酵素」への言及は、DHK, DHQ, ナリンゲニン、エリオディクトイルの1つ又は複数に作用するフラボノイド経路のヒドロキシル化酵素を包含する。

好ましくは、DHK ヒドロキシル化酵素は3', 5'-ヒドロキシラーゼである。しかしながら、この酵素をコードする遺伝子配列をクローン化するために使用される方法は、3'-ヒドロキシラーゼのごとき酵素をコードする他の遺伝子配列を単離するために使用することもできよう。従って、この明細書において3', 5'-ヒドロキシラーゼの単離及びクローニングへの言及は3'-ヒドロキシラーゼのごとき他のフラボノイドヒドロキシル化酵素への言及を包含すると理解されるべきである。

「核酸单離体」なる用語は、非天然存在状態にある遺伝子配列を意味する。これは一般に、その天然状態から分離されていること、又はその天然環境において必ずしも遭遇しない方法により形成されたことを意味する。さらに具体的には、それはインビトロで形成され又は維持される核酸分子、組換え又は合成分子、及び異種核酸と組合せられた核酸を包含する。それはまた、他の核酸配列に比べて少なくとも部分的に精製された後の天然配列に拡張される。

本明細書において使用する場合、「遺伝子配列」とは、DHK ヒド

ロキシル化酵素、例えば3', 5'-ヒドロキシラーゼ中のアミノ酸の配列を直接的に特定するか又は塩基の相補的連続を介して特定するヌクレオチド塩基の連続を意味する。核酸又はその相補形は全長酵素又はその誘導体もしくは部分をコードすることができる。

「誘導体」とは、天然酵素に対する任意の单一の又は複数のアミノ酸置換、除去及び/又は付加を意味する。これに関し、核酸は3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードする天然核酸配列を含み、あるいは該天然配列に対して1又は複数のヌクレオチド置換、除去及び/又は付加を含んでいてもよい。本明細書において予定される核酸配列はまたは遺伝子プローブとして又は植物における対応する遺伝子の発現を制御することができる「アンチセンス」分子として有用なオリゴヌクレオチド配列を包含する。従って、核酸又はその相補形が3', 5'-ヒドロキシラーゼの「部分」をコードする場合、この様な核酸分子はオリゴヌクレオチドプローブとしてあるいはポリメラーゼ連鎖反応のための又は種々の変異誘発法におけるプライマーとして有用であろう。

本発明のDHK ヒドロキシル化酵素のそして特に3', 5'-ヒドロキシラーゼのアミノ酸挿入誘導体には、アミノ末端及び/又はカルボキシ末端融合体並びに单一アミノ酸又は複数のアミノ酸の配列内挿入体が含まれる。挿入アミノ酸配列変形体は蛋白質中の所定の部位に1又は複数のアミノ酸残基が導入されたものであるが、得られる生成物の適切なスクリーニングを用いればランダム挿入も可能である。除去変形体は、配列からの1又は複数のアミノ酸の除去により特徴付けられる。置換アミノ酸変形体は、配列中の少なくとも1個の残基が除去されそしてその位置に異なる残基が挿入されているものである。典型的な置換は、次の表1に行って作られるものである。

表 1
アミノ酸置換のための適当な残基

もとの残基	置換の例
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn; Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln; Glu
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

3', 5'-ヒドロキシラーゼがアミノ酸置換によって誘導体化される場合、アミノ酸は一般に、類似の性質、例えば疎水性、親水性、電子陰性、大きい側鎖等を有する他のアミノ酸により置き換える。アミノ酸置換は典型的には単一残基によるものである。アミノ酸挿入は通常約1~10アミノ酸残基のオーダーであり、そして

除去は約1~20残基の範囲である。好ましくは、除去又は挿入は隣接対において、すなわち2残基の除去又は2残基の挿入として行われる。

前記のアミノ酸変形体は、当業界においてよく知られているペプチド合成技法例えば固相合成法(Merrifield, 1964)等を用いて、又は組換えDNA操作により作ることができる。既知の又は部分的に知られた配列を有するDNAの所定の部位に置換変異を行う方法はよく知られており、そして例えばM13変異誘発法を包含する。置換、挿入又は除去変形体として現われる変形体蛋白質を製造するためのDNA配列の操作は、例えばSambrookら(1989)に従来から記載されている。

本発明の3', 5'-ヒドロキシラーゼの組換え又は合成変異体及び誘導体の他の例には、該酵素と関連する任意の分子、例えば炭水化物、脂質及び/又は蛋白質もしくはポリペプチドの1又は複数の置換、除去及び/又は付加が包含される。

「類似体」及び「誘導体」なる用語はまた、3', 5'-ヒドロキシラーゼの任意の機能的化学的同等物にそしてさらに前記のアミノ酸誘導体に拡張される。

本発明の核酸は、リボ核酸又はデオキシリボ核酸であることができ、単鎖又は二本鎖であることができ、そして直鎖状又は共有結合により閉じられた環状分子であることができる。本発明はまた、低い、好ましくは中程度のそして最も好ましくは高いストリンジンシート条件下で本発明により予定される核酸分子とハイブリダイズする他の核酸分子に拡張される。他の用語で表現すれば、本発明は、図9もしくは図10に示されるヌクレオチド配列を有する核酸分子に、あるいはヌクレオチド又はアミノ酸配列のレベルにおいて少なくとも35%、好ましくは少なくとも45%、さらに好ましくは少なくとも

特表平6-500239 (5)

55%、さらに好ましくは少なくとも65~70%、そして一層好ましくは85%以上の類似性を有する分子(ここで、核酸は3'、5'−ヒドロキシラーゼ活性を有する酵素をコードするか又はそれをコードする配列に相補的である)に拡張される。しかしながら、ヌクレオチド配列又はアミノ酸配列は前記の%より低い類似性を有しそしてなおDHKヒドロキシル化酵素をコードすることができ、そしてこの様な分子もそれらが相同性の領域を保存している場合には本発明の範囲内に考えられることに注目すべきである。本発明はまた、低い、好ましくは中程度のそして最も好ましくは高いストリンジェンシー条件下で、上に予定された核酸分子の部分とハイブリダイズすることができるオリゴヌクレオチドプライマーの形の核酸分子に拡張される。

ここに予定される核酸分子は単独で存在することもでき、又はベクター分子そして好ましくは発現ベクターとの組合せにおいて存在することもできる。この様なベクター分子は真核細胞及び/又は原核細胞中で複製しそして/又は発現する。好ましくは、ベクター分子又はその部分は植物ゲノムに組み込まれ得る。核酸分子はまた、植物細胞中の核酸分子の発現を指令することができるプロモーター配列を含むことができる。核酸分子及びプロモーターは、任意の手段により、例えばエレクトロポレーション又はアグロバクテリウム(*Agrobacterium*)介移行により細胞に導入され得る。

ペチュニアは今日最も便利で且つ好ましい材料源を代表するので、本発明はペチュニア由来の核酸配列を用いて例示される。しかしながら、当業者は、他の植物又はある種の微生物のごとき任意の分離源から類似の配列が単離されることをただちに理解するであろう。3'−ヒドロキシラーゼの遺伝特性はキンギョソウ(*Antirrhinum*)、バーベナ(*Verbena*)及びペチュニア(*Petunia*)の花並びにトウモロコシのシトクロムP450酵素であると考えられた(Heller及びForkmann, 1988)。しかしながら、これらの及び他の植物種からの3'、5'−ヒドロキシラーゼ遺伝子のクローニングの公表された報告は存在しない。

3'、4'、5'−ヒドロキシル化フラボノイド又はそれらの誘導体を生産することができる他の植物種には、アジサイ(Kakeduら、1985)、ヒエンソウ(Asenら、1975)、リシアンサス(Lisanthus)(Asenら、1986)、トマト(von Wettstein-Knowles, 1986)及びボテト(Harborne及びSimmonds, 1968)が含まれる。これらの種又は3'、4'、5'−ヒドロキシル化フラボノイドを生産することができる他の植物もまた3'、5'−ヒドロキシラーゼ遺伝子の単離源として適当であろう。フラボノイド経路の酵素(例えば、3'、5'−ヒドロキシラーゼ)を直接又は間接にコードするこの様なすべての核酸配列は、その由来に関係なく本発明に含まれる。

同様に、本明細書に略記する遺伝子クローニング法を用いて、3'、4'、5'−ヒドロキシル化フラボノイド類を生産する他の植物から3'、5'−ヒドロキシラーゼ遺伝子を単離することができる。実験手順の些細な変更は要求されるかもしれないが、本明細書に記載するのと同じ技法を用いて、類似の遺伝子配列を検出し、単離しそしてクローニングするためにここに開示されるクローン及びオリゴヌクレオチドを用いることができる。その様な些細な変更のすべてが本発明に含まれる。3'、5'−ヒドロキシラーゼのごとき酵素の他の適当な入手源の例には、バーベナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ボテト、パンジー及びナスが含まれる。

本発明に従えば、3'、5'−ヒドロキシラーゼのごときDHKヒドロキシル化酵素をコードする核酸配列をトランスジェニック植物

コシの発生及び糊粉層において知られている(Heller及びForkmann, 1988)。遺伝子_{eos}はキンギョソウ(*Antirrhinum*)において3'−ヒドロキシラーゼを調節し(Forkmann及びStotz 1981)、他方_{Ht1}遺伝子及び_{Pr}遺伝子はそれぞれペチュニア(*Petunia*)(Stotzら、1985)及びトウモロコシの糊粉層(Larson及びBussard, 1986)において同様の酵素を調節する。例えば、バーベナ・ハイブリダ(*Verbena hybrida*)の化学遺伝学的(chemogenetic)研究が示すところによれば、この植物において、アントシアニンのB環の3'及び5'の両位置におけるヒドロキシル化は1つの遺伝子により調節される(Beale, 1940)。3'、5'−ヒドロキシル化の酵素活性はデルフィニジン(delphinidin)生産株の花の抽出物中にのみ存在する(Stotz及びForkmann, 1982)。3'及び5'位におけるヒドロキシル化のためのNADPH-依存性ミクロソーム酵素活性はまたカリステラス(*Callistephus*)及びラザルス(*Lathyrus*)の花抽出物中に証明された(Forkmann, 1991)。V.ハイブリダ(*V. hybrida*)の場合と同様に、フラバノン類及びジヒドロフラバノン類の3'、5'−ヒドロキシル化のための酵素活性は花に3'、4'、5'−ヒドロキシル化されたフラボノイド化合物(又はそれらのメチル化誘導体)を含有する株の花抽出物中にのみ存在することが見出された。従って、3'、4'、5'−ヒドロキシル化フラボノイド類の生成は明らかにフラボノイド3'、5'−ヒドロキシラーゼ活性に依存する。

3'、5'−ヒドロキシラーゼをコードする遺伝子は、カリステラス(*Callistephus*)(R)、ペチュニア(*Petunia*)(Hf1, Hf2)及びベルベナ(*Verbena*)(P)を含めて多くの観賞用植物において、デルフィニジンを生産することができない対応する変異株の存在によって同定されている。さらに、各酵素活性が証明されている(Forkmann, 1991)。3'、5'−ヒドロキシラーゼはまたミクロソ

ムのシトクロムP450酵素であると考えられた(Heller及びForkmann, 1988)。しかしながら、これらの及び他の植物種からの3'、5'−ヒドロキシラーゼ遺伝子のクローニングの公表された報告は存在しない。

3'、4'、5'−ヒドロキシル化フラボノイド又はそれらの誘導体を生産することができる他の植物種には、アジサイ(Kakeduら、1985)、ヒエンソウ(Asenら、1975)、リシアンサス(Lisanthus)(Asenら、1986)、トマト(von Wettstein-Knowles, 1986)及びボテト(Harborne及びSimmonds, 1968)が含まれる。これらの種又は3'、4'、5'−ヒドロキシル化フラボノイドを生産することができる他の植物もまた3'、5'−ヒドロキシラーゼ遺伝子の単離源として適当であろう。フラボノイド経路の酵素(例えば、3'、5'−ヒドロキシラーゼ)を直接又は間接にコードするこの様なすべての核酸配列は、その由来に関係なく本発明に含まれる。

同様に、本明細書に略記する遺伝子クローニング法を用いて、3'、4'、5'−ヒドロキシル化フラボノイド類を生産する他の植物から3'、5'−ヒドロキシラーゼ遺伝子を単離することができる。実験手順の些細な変更は要求されるかもしれないが、本明細書に記載するのと同じ技法を用いて、類似の遺伝子配列を検出し、単離しそしてクローニングするためにここに開示されるクローン及びオリゴヌクレオチドを用いることができる。その様な些細な変更のすべてが本発明に含まれる。3'、5'−ヒドロキシラーゼのごとき酵素の他の適当な入手源の例には、バーベナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ボテト、パンジー及びナスが含まれる。

好ましくは、DHKヒドロキシル化酵素は3'、5'−ヒドロキシラーゼであり、発生段階に依存的(developmental)に制限され、そして変化した花は受容体植物の生理由条件に依存して青色もしくは赤色の花又は他の色の色相の生成を誘導する。「適当な植物」とは、3'、5'−ヒドロキシラーゼ酵素のための基質を生産することができ、そして所望の色の発生のために必要な適当な生理的性質及び

遺伝子型を有することができる植物を意味する。これはバラ、ペチュニア、カーネーション、キク及びガーベラを包含するがこれに限定されない。幾つかの植物種のおいては、平均花弁液泡pHより高いpHを有する品種として定義される「高pH系」を選択することが望ましいであろう。組換え3'、5'-ヒドロキシラーゼ又はその変異体及び誘導体の源は前記した通りであり、そしてペチュニア、バーベナ、ヒエンソウ、ブドウ、アイリス、フリージア、アジサイ、シクラメン、ポテト、パンジー又はナス由来の酵素を含む。

当業者は、この方法に適用可能な変法、例えば標的の植物に天然に存在する酵素の発現の増加又は減少を認識するであろう。これは色の異なる色相、例えば青又は赤の異なる色相を導くであろう。

標的酵素、例えば3'、5'-ヒドロキシラーゼの活性を低下させるため、この酵素又はその種々の部分をコードする核酸配列をアンチセンス配向において使用することができるであろう。本発明はいずれか1つの理論に限定することを望むわけではないが、この様なアンチセンス核酸配列は酵素について特定される天然mRNAの全部又は部分とデュプレックスを形成する可能性がある。あるいは標的核酸配列を不活性化するためにリボザイムを使用することができる。

従って本発明は、組換えジヒドロカンフェロール(DHK)ヒドロキシル化酵素を発現することができるか、又はDHKヒドロキシル化酵素に翻訳され得るmRNA分子の全部又は部分に実質的に相補的な核酸配列の転写を指令するトランスジェニック植物の製造方法に並びされ、この方法は、適当な植物の細胞に、請求項1又は6に記載の核酸単離体を、該核酸単離体の最終的発現を許容する条件下に導入し、該細胞からトランスジェニック植物を再生し、そして該核酸単離体の発現を可能にするのに十分な時間及び条件で該トランスジェニック植物を生長せしめることを含んで成る。この態様において、適当

な受容植物は特にアイリス、チューリップ、ユリ、リシアンサス(Lisanthus)、フリージア、ヒエンソウ、リモニウム(Limonium)及びペラルゴニウム(Pelargonium)に並びられる。

従って、トランスジェニック植物を製造するための上記の方法は、アンチセンスmRNA又はオリゴヌクレオチドをコードする遺伝子又はDNA断片を、3'、5'-ヒドロキシラーゼをコードするか又はこれをコードする配列に相補的なヌクレオチド配列のすべて又は部分又は領域に導入するという別法に並びられる。

従って、本発明は、本発明の核酸配列のすべて又は部分、あるいはそのアンチセンス形、及び/又はその任意の同族体又は変化した形を含有するすべてのトランスジェニック植物、そして特に変化した花を示すトランスジェニック植物に並びられる。従って、トランスジェニック植物は、DHKヒドロキシル化酵素をコードするか又はそれをコードする配列に相補的なヌクレオチド配列を含んで成る安定に導入された核酸分子を含有し、そして特に、上記のような導入された核酸配列を単離する高pH植物系である。本発明はまた、この様なトランスジェニック植物からの種子に関する。この様な種子は、特に着色されていれば、植物のための所有権として有用であろう。

本発明のさらなる観点は、DHKが水分解酵素の組換え形、特に組換え3'、5'-ヒドロキシラーゼに向けられる。本酵素の組換え形は、例えば、さらに活性な酵素を開発するための研究用材料源を提供し、そして着色された化合物の製造のためのインピトロ系を開発するため有用であろう。

本発明の他の観点は、植物からのシトクロムP450分子又は類似の分子をコードするか又はそれをコードする配列に対して相補的なヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子のクローニング方法を含み、この方法は、既知ミクロソームのシトクロムP450分子の1又は複数

のコンセンサス配列に由来するヌクレオチド配列を有する1又は複数のオリゴヌクレオチドプライマーを用いるポリメラーゼ連鎖反応による前記植物の細胞からの核酸分子の適当な調整からのクロモソームP450ヌクレオチド配列又は相補的配列の増幅を含んで成る。

関連する態様において、シトクロムP450核酸分子又はその相補的配列をクローニングする方法は、適当なcDNAライブラリーから既知のシトクロムP450分子の1又は複数のコンセンサス配列に対応する1又は複数のオリゴヌクレオチドプライマーにハイブリダイズすることができるクローラーを選択することを含んで成る。

好ましくは、コンセンサス配列の1つはシトクロムP450分子のヘム結合ドメインからのものであり、さらに好ましくはF(G,S)XGXRXCG(ここでXは任意のアミノ酸である)又はPGFAGRRICPGである。最も好ましい態様において、クローニングされるべき核酸は、DHKヒドロキシル化酵素、そして特に3'、5'-ヒドロキシラーゼをコードするか又はそれをコードする配列に対して相補的である。さらに好ましくは、3'、5'-ヒドロキシラーゼは前に記載したようなものであり、そしてさらに詳しくは図9又は図10に示すようなアミノ酸配列を有するか又はヌクレオチド配列によりコードされ、あるいは前に定義したようにそれに類似性を有する。

次に、図及び例に言及しながら本発明をさらに記載するが、それらに限定されるものではない。

図1(A)及び(B)はフラボノイド色素の生合成経路の模式図である。経路の最初の部分に関与する酵素は次のように表示されている。PAL = フェニルアラニン・アンモニアーリアーゼ; C4H = シンナメート・4-ヒドロキシラーゼ; 4CL = 4-クマレート; CoAリアーゼ; CHS = カルコンシンサーゼ; CHI = カルコンフラボンイソメラーゼ; P3H = フラバノン・3-ヒドロキシラーゼ; DFR = ジ

ヒドロフラボノール-4-レダクターゼ; UFGT = UDP-グルコース: フラボノイド-3-O-グルコシルトランスクレオチダーゼ。後の段階はP.ハイブリダ(P. hybrida)の花において起こる変換に対応し、そして1=シアニジン-3-グルコシド及びデルフィニジン-3-グルコシドのグルコシル残基へのラムノース糖の付加; 2=アシリ化及び5-O-グルコシル化; 3=3'-メチル化; 4=5'-メチル化; 5=3'、5'-メチル化を含む。

図2(A)は、P.ハイブリダcv V23(Hf1/Hf1, Hf2/Hf2)の花弁抽出物中の3'、5'-ヒドロキシラーゼ活性、及びP.ハイブリダcv R51(hf1/hf1, hf2/hf2)における3'、5'-ヒドロキシラーゼ活性はH-ナリンゲニンの3'-及び3'、5'-ヒドロキシル化誘導体エリオジクチオール(eriodictyol)及びベンタヒドロキシフラバノンへの転換により検出された。この図の左側に、反応の基質ナリンゲニン並びに3'-ヒドロキシラーゼ生成物エリオジクトール及び3'、5'-ヒドロキシラーゼ反応の生成物ベンタヒドロキシフラバノンが示されている。TLCプレート上の基質及びヒドロキシル化生成物の位置がこの図の右側に示されており、これは左から右に、P.ハイブリダcv V23及びP.ハイブリダcv R51からの花の花弁抽出物により生成される反応生成物並びにNADPHが反応混合物から省略された場合にナリンゲニンのヒドロキシル化が生じないことを示す対照のオートラジオグラフを示す。

図2(B)は、異なる発達段階におけるP.ハイブリダcv Old Glory Blue(OGB)花の花弁抽出物中の3'、5'-ヒドロキシラーゼ活性を示す。左から右に、TLCプレートのオートラジオグラフは(1)段階1の花(未着色、閉じたつぼみ(長さ<25mm)) : ナリンゲニンから3'、5'-ヒドロキシル化誘導体ベンタヒドロキシ

特表平6-500239 (ア)

フラバノンへの限定的な転換、(2)段階2の花(着色、閉じたつぼみ(長さ25~35mm))：より高い3'、5' -ヒドロキシラーゼ活性を示す、ペントヒドロキシフラバノンへの増加した転換、(3)段階3の花(出現しつつある花冠を伴う濃紫のつぼみ(長さ>35mm))：最高3'、5' -ヒドロキシラーゼ活性、(4)段階4の花(濃紫の開いた花、花裂開前(長さ>50mm))：最高3'、5' -ヒドロキシラーゼ活性、(5)段階5の花(十分に開いた花。すべての花裂開)：検出可能なレベルの3'、5' -ヒドロキシラーゼなし。

図3(A)はシトクロムP450をコードするmRNA分子の模式的表示である。黒くした領域は、ヘム結合ドメインをコードする配列の相対位置を示す。このドメインの最も保存された領域のコンセンサスアミノ酸配列は1文字コードを用いて示されている。SWISS-PROTデータベース中に存在するシトクロムP450配列の100%に存在するアミノ酸は箱で囲まれており、そしてXは低レベルの配列の保存が存在する位置を示す。

図3(B)は、cDNAライブラリー#1からのシトクロムP450分子pCGP450及びpCGP454のPCR増幅のために使用されたオリゴの部分を示す。オリゴ1及び3は保存されたヘム結合ドメイン中の配列をカバーし、他方オリゴ2及び4はそれぞれpBluescript(Strategene)-20及び逆プライマー配列に対応した。オリゴ1及び2はpCGP450中のcDNA挿入部を合成するために用いられ、オリゴ3及び4はpCGP454中のcDNA挿入部を合成するために使用された。一般化されたcDNA分子の表示は図3Aに示されるものと同じであり、ベクター配列は薄い陰により示されている。

図4(A)は、pCGP174及びpCGP175を含めてシトクロムP450同族を同定するためにcDNAライブラリー#1をプローブするのに用い

たDNA断片の模式的表示である。P450=黒い箱により示されるヘム結合ドメイン(Heme)を伴う、一般化されたシトクロムP450cDNA:断片1=900bp断片は構型としてpCGP142 DNAを用い、オリゴ5及び6を用いるPCRにより得られ；断片2=1.2Kb断片は、pCGP147のSall-EcoRI消化により単離され；断片3=750bp断片は構型としてpCGP158 DNAを用い、オリゴ4及び7を用いるPCRにより得られ；断片4=670bp断片は、pCGP160のPstI-EcoRV消化により単離され；断片5=150bp断片は構型としてpCGP454 DNAを用い、オリゴ3及び4を用いるPCRにより得られた。すべての精製された断片は「材料及び方法」の項に記載したようにして³²P-dCTPによりラベルした。

図4(B)～(H)は、(i) pCGP142、(ii) pCGP147、(iii) pCGP158、(iv) pCGP160及び(v) pCGP454からのcDNA挿入部についての部分ヌクレオチド配列及び対応する推定アミノ酸翻訳生成物を示す。cDNAライブラリーをプローブしてpCGP174及びpCGP175を単離するために使用した領域は矢印で示されている。

図5(A)及び(B)はそれぞれプラスミドpCGP174及びpCGP175のダイアグラム表示である。cDNA挿入部は中空箱で示されており、仮定的ヘム結合ドメインをコードする領域は黒箱で示されている。両cDNA挿入部のEcoRI部位は5' -末端にあり、そしてXbaI部位は3' -末端にある。

図6(A)はpCGP174 cDNA挿入部の3' -領域によりプローブされたDNAプロットのオートラジオグラフである。各レーンは次のペチュニア組織から単離された全RNAの20μgのサンプルを含んだ。1～5は、「材料及び方法」の項に記載する花の発達の5つ(1～5)の異なる段階における花のOGBの周縁組織であり；Tは段階3～4の花からのOGBの管組織であり；Lは、OGBの6週間の実生からの葉組織である。

実生からの葉組織であり；ILは、OGBの6週間の実生からのゲルコース／高光処理された葉組織であり；V23は段階3～4の花からのV23の周縁(limb)組織であり；R51は段階3～4の花からのR51花冠組織であり；VRは、V23,R31のF₁雜種の段階3～4の花からの花弁周縁組織であり；Sw63Iは、Sw63の段階3～4の花からの花弁周縁組織であり；そしてTh7は、Th7の段階3～4からの花弁周縁組織である。

図6(B)はV23,R51(V/R)F₁植物のRFLP分析からの代表的なオートラジオグラフである。XbaIで消化されたゲノムDNAがpCGP174の3' -領域によりプローブされた。プローブに強くハイブリダイズするV23断片が、花の管組織中で3'、5' -ヒドロキシラーゼ活性(+)を有するすべてのF₁植物において検出された。強くハイブリダイズするバンド(RFLP#1)についてのRFLP判定が種々の植物について示された。V:V23 - 様RFLP, R:R51 - 様RFLP, H:ヘテロ接合性(VR)RFLP。

図7(A)はpCGP175 cDNA挿入部の3' -領域によりプローブされたRNAプロットのオートラジオグラフである。各レーンは次のものから単離された全RNAの20μgのサンプルを含有した。1～5は、「材料及び方法」の項に記載する花の発達の5つ(1～5)の異なる段階における花のOGBの周縁組織であり；Tは段階3～4の花からのOGBの管組織であり；Lは、OGBの6週間の実生からの葉組織であり、ILは、OGBの6週間の実生からのゲルコース／高光処理された葉組織であり；V23は、段階3～4の花からのV23周縁組織であり；R51は段階3～4の花からのR51花冠組織であり；VRは、V23,R31のF₁雜種の段階3～4の花からの花弁周縁組織であり；Sw63Iは、Sw63の段階3～4の花からの花弁周縁組織であり；そしてTh7は、Th7の段階3～4の花からの花弁周縁組織である。

図7(B)は、V23,R51(V/R)F₁植物のRFLP分析からの代表的なオートラジオグラフである。XbaIで消化したゲノムDNAがpCGP175の3' -領域によりプローブした。pCGP175プローブを用いて得られるRFLP判定はchi-Aプローブを用いて帰属されるpo判定と同じであった。V:V23 - 様RFLP, R:R51 - 様RFLP, H:ヘテロ接合性(VR)RFLP。

図8は、pCGP602の制限酵素地図のダイアグラム表示である。クローニングに用いたベクターを除くcDNA挿入部の長さが、太線で示される。これらはM13mp18及びmp19にサブクローニングされ、そして示されるオリゴヌクレオチドプライマー配列を用いて配列決定され、オーバーラップする配列情報を得られた。各サブクローニングの断片から得られた配列情報の範囲及び方向を半矢印を付した線により示す。S1=プライマー配列1:S2=プライマー配列2:S3=プライマー配列3。ATGはメチオニン開始コドンを示し、クローンの長さ(塩基対)も示される。

図9(A)～(D)はpCGP176及びpCGP602からのcDNA挿入部のヌクレオチド配列及び推定されるアミノ酸配列を示す。pCGP602からの挿入部は、示される全配列を含む。pCGP176挿入部の5' -末端が矢印により示される。

図10(A)～(C)はpCGP175からのcDNA挿入部のヌクレオチド配列及び推定されるアミノ酸配列を示す。

図11はpCGP618の作製のダイアグラム表示である。pCGP618は、発現ベクター-pYGA22m中の酵母グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター(PGPD)の後にpCGP175 cDNA挿入部をセンス方向にクローニングすることにより作製された。pCGP175からのcDNA挿入部をEcoRI-KpnI断片として、pYGA22mのEcoRI-KpnI消化から生ずる大断片と連結した。E=EcoRI, H=HindIII, K=KpnI。

X = XbaI, IR = 2 μm プラスミドの逆転反復、T_{RP} = T_{RP} 遺伝子、Ap = アンピシリン耐性マーカー。

図12(A)は、基質として³H-ナリンゲニンを使用しての酵素抽出物の3', 5'-ヒドロキシラーゼアッセイを示す。このオートラジオグラフは、プラスミドpCGP618により形質転換された酵母の抽出物による、³H-ナリンゲニンの3', 5'-ヒドロキシル化誘導体ペントヒドロキシフラバノンへの転換を示す(1及び2)。形質転換されていない酵母においては3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性は検出されなかった(C)。OGBの3', 5'-ヒドロキシラーゼによるナリンゲニンのペントヒドロキシフラバノンへの転換も示される(OGB C)。

図12(B)は、基質として³H-ジヒドロケルセチン(dihydroquercetin)を使用しての、酵母抽出物の3', 5'-ヒドロキシラーゼアッセイを示す。このオートラジオグラフは、プラスミドpCGP618により形質転換された酵母の抽出物による³H-ジヒドロケルセチン(DHQ)の³H-ジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)(DHM)への転換を示す(1及び2)。形質転換されていない酵母においては3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性は検出されなかった(C)。OGBの3', 5'-ヒドロキシラーゼによるDHQのDHMへの転換も示される(OGB C)。

図13は、基質として³H-ナリンゲニンを用いての酵母抽出物の3', 5'-ヒドロキシラーゼアッセイを示す。このオートラジオグラフは、プラスミドpCGP618及びpCGP620により形質転換された酵母の抽出物による、³H-ナリンゲニンの3', 5'-ヒドロキシル化誘導体ペントヒドロキシフラバノンへの転換を示す(それぞれ、1及び2)。pCGP620抽出物から得られた反応生成物はさらに3'-ヒドロキシル化エリオジクチオール(eriodictyol)及びものナ

リンゲニン基質の幾らかを含んでおり、3', 5'-ヒドロキシル化最終生成物への転換が不完全であることが示された。形質転換されていない酵母においては3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性は検出されなかった。

図14は、プラスミドpCGP90のダイアグラム表示である。示されるように、pCGP602からのcDNA挿入部が発現ベクターpCGP293のMacプロモーターの後にセンス方向にクローニングされている。

図15は、ペチュニアの花弁抽出物の3', 5'-ヒドロキシラーゼアッセイを示す。このオートラジオグラフは、Skr4 x Sw63の花弁周縁組織(L)中に低レベルの3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性(³H-ナリンゲニンの³H-ペントヒドロキシフラバノンへの転換)が存在することを示している。2種類のSkr4 x Sw63/pCGP90トランスジェニック(T/G 1602及びT/G 1603)の円周組織(L)中に有意に高レベルの活性が検出された。非トランスジェニックSkr4 x Sw63雄株又は2種類のpCGP90トランスジェニックのいずれの花弁管(T)の抽出物にも3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性が検出されなかった。OGBの周縁(L)及び管(T)花弁組織の抽出物による、ナリンゲニンのペントヒドロキシフラバノンへの転換も示される。

図16は、³²P-ラベルされたHf I cDNAによりプローブされたRNAプロットのオートラジオグラフの写真表示である。各レーンは、(1) P. ハイブリダ(P. hybrida)cv. OGBの花弁、(2) パンジーの花弁、(3) ジャガイモの茎、(4) ナスの皮、(5) ニコチアナ・アラト(Nicotiana alata)の花、(6) アゲラツム(Ageratum)の花から単離された全RNAの20 μgのサンプルを含有した。A及びCのために使用したプローブは660bp BamI DNA断片に由来し、1.4Kb EcoRI/HindIII断片をCのために使用した。使用した洗浄条件は、(A) 55°Cにて6xSSC、(B) 50°Cにて2xSSC、(C) 65°Cにて

0.2xSSCであった。

図17は、³²P-ラベルHf I cDNAによりプローブされたサザンプロットのオートラジオグラフの写真表示である。各レーンは、EcoRIで消化された10 μgのDNAを含有した。DNAサンプルは、(1) ナス、(2) オランダアイリス、(3) ジャガイモ、(4) スミレ及び、(5) アネモニから単離された。洗浄条件は、(A) 50°Cにて6xSSC、及び(B) 65°Cにて2xSSCであった。

実験例

1. 材料及び方法

化学物質酵素及びラジオアイソトープ

エリオジクチオール(eriodictyol)及びジヒドロケルセチン(dihydroquercetin)はCarl Roth KGから入手し、そしてナリンゲニンはSigmaから入手した。ジヒドロミリセチン(dihydromyricetin)はVercrasseら(1985)の方法によりミリセチン(myricetin)から化学的に合成した。³H-ナリンゲニン(5.7Ci/mmole)及び³H-ジヒドロケルセチン(12.4Ci/mmole)はAmerchamから入手した。すべての酵素は市販品であり、そして製造者の指示に従って使用した。

細菌株

使用した大腸菌(Escherichia coli)株は次の通りであった。

DH5α supE44.Δ(lacZΔ-ArgF)U169, φ80_rlacZΔW15, hsdR17(r_m⁻, m_s⁺), recA1, end A1, gyrA96, thi-1, relA1, deoR, (Hanahan, 1983及びBRL, 1986).

XL1-Blue supE44, hsdR17(r_m⁻, m_s⁺), recA1, end A1, gyrA96, thi-1, relA1, lac-, [F' proAB, lac*, lacZΔW15, Tn10(tet')], (Bullockら, 1987).

PLK-F' recA, hsdR17(r_m⁻, m_s⁺), mcrA⁻, mcrB⁻, lac, supE44, galK2.

galT22, metB1, [F' proAB, lac*, lacZΔW15, Tn10(tet')]
(Stratagene).

無力にされた(disarmed)アグロバクテリウム・ツメファシエンス(Agrobacterium tumefaciens)AGLO株(Lazoら, 1991)はR. Ludwig(カリフォルニア大学生物学部、サンタクラルツ)から入手した。

クローニングベクターpBluescript及びpBluescribeはStratageneから入手した。

大腸菌及びA. ツメファシエンスの形質転換

大腸菌DH5α細胞の形質転換はInoueら(1990)の方法に従って行った。コンビテントAGLO細胞を、50mL MG/L培地(文献)に接種後28°Cで16時間培養して調整した。その100 μLに5 μgのプラスミドDNAを加えることにより、プラスミドpCGP90(図14)をアグロバクテリウム・ツメファシエンスAGLO株に導入した。次に、細胞をペレット化し、そして0.5mLの85% (v/v)100mM CaCl₂/15% (v/v)グリセロール中に再懸滴した。液体N₂中で2分間インキュベートすることによりDNA-アグロバクテリウム混合物を解凍し、そして次に37°Cにて5分間のインキュベーションにより凍結した。次に、DNA/細胞混合物をさらに10分間氷上に置いた。次に、細胞を1 mLのMG/L培地に加え、そして28°Cにて16時間振とうしながらインキュベートした。pCGP90を有するA. ツメファシエンスの細胞を、100 μg/mLのゲンタマイシンを含有するMG/L寒天プレート上で選択した。ゲンタマイシン耐性形質転換体から単離されたDNAのサザン分析によりpCGP90の存在を確認した。

使用したペチュニア・ハイブリダ(Petunia hybrida)の品種を表2に示す。

表2
植物材料

植物品種	性質	由来／文献
Old Glory Blue (OGB) F ₁ Hybrid	Ball Seed, USA	
V30	An1, An2, An3, An4, An6 An8, An9, An10, An11, Ph1, Ph2, Ph3, Ph4, Ph5, Hf1, Hf2, Ht1, Ht2, Rt, Mt1, Mt2, mf1, po, Gf	Koesら(1986)
V23	An1, An2, An3, An4, An6 An8, An9, An10, ph1, Hf1, Hf2, ht1, Rt, Po, Bl, Pl	Wallrothら(1986) Doodemanら(1984)
R51	An1, An2, An3, an4, An6 An8, An9, An10, An11, Ph1, ht1, hf2, Ht1, rt, po, bl, fl	Wallrothら(1986) van Tunen ら(1990) Doodemanら(1984)
Sw63	An1, An2, An3, an4, An6 An8, An9, An10, An11, Ph1, Ph2, Ph5, hf1, hf2 ht1, ht2, rt, po, mf1, fl, Gf	I.N.R.A., Dijon, Cedex. フランス Doodemanら(1984)
Th7	An1, An2, An3, An4, An6 An9, An10, An11, Hf1, Hf2, Ht1, Ht2, Ph1, Ph2, Ph5, Rt, po, mf1, mf2, Gf, fl	I.N.R.A., Dijon, Cedex. フランス

ウム (pH7.5), 1 mM EDTA, 0.25M シュークロース, 0.25M マンニトール、0.1% (v/v) BSA, 100nM ベプスタチン, 100nM ロイベブチン, 0.1 mg/mL PMSF, 20mM 2-メルカブトエタノール及び10 mg/mL ポリクリ (polyclar)AT 中でホモゲナライズした。ホモジネートを10,000 rpm にてJA20ローター (Beckman) 中で4°Cにて10分間遠心し、そして上清の一部を3', 5' -ヒドロキシラーゼ活性についてアッセイした。

3', 5' -ヒドロキシラーゼアッセイ

3', 5' -ヒドロキシラーゼ酵素の活性は、Stotz 及びPorkmann (1982) により記載された方法の変法を用いて測定した。アッセイ反応混合物は典型的には100 μL の抽出抽出物、5 μL の50mM NADPH /アッセイ緩衝液 (100mM リン酸カリウム (pH8.0), 1 mM EDTA, 及び20mM 2-メルカブトエタノール) 、及び10 μCi の (³H) ナリンゲニン又は5 μCi の (³H) ジヒドロクエルセチンを含有しており、そしてアッセイ緩衝液により最終体積210 μL にした。23°Cにて2 ~16時間のインキュベーションの後、反応混合物を0.5 mL の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル相を真空乾燥し、そして10 μL の酢酸エチルに再懸濁した。トリチル化されたフラボノイド分子をセルロース薄層プレート (メルクArt5577, 独国) 上で、クロロホルム /酢酸 /水 (10: 9: 1 v/v) 溶剤系を用いて分離した。クロマトグラフィーの完了の際、TLC プレートにエーテル中 7% (v/v) 2, 5-ジフェニルオキサゾールを噴霧した。反応生成物をオートラジオグラフィーにより局在化し、そして反応生成物と並んで泳動されそしてUV光のもとで可視化された、非放射性ナリンゲニン、エリオジクチオール、ジヒドロクエルセチン及びジヒドロミルセチン標準との比較により同定された。

Skr4	An1, An2, An3, An4, An6 An11, hf1, hf2, ht1, Ph1, Ph2, Ph5, rt, Po, Mf1, Mf2, fl	I.N.R.A., Dijon, Cedex. フランス
Skr4 x Sw63	Skr4 x Sw63 F ₁ 雄種	
Rw14	An1, An2, An4, Ph1, ph2, Ph5, hf1, hf2, Ht1, Rt, Po, Bl, Lgi, Lui, Vs1, Vs3, Vs5, la, Ygl, ws, Gf, Mt1, Mf2, fl	I.N.R.A., Dijon, Cedex. フランス
Rp57	An1, An2, An4, Ph1, ph2, Ph5, hf1, hf2, Ht1, Rt, Po, Mt, Mf, fl, Gf, Bl, Lgi, Lui, Vs1, Vs3, Vs5, Ygl, ws	I.N.R.A., Dijon, Cedex. フランス
Rp57 x Rw14	Rp57 x Rw14 F ₁ 雄種	

植物を特別の成育室で、1日14時間10,000ルックスの光強度及び22~26°Cの温室にて成育させた。OGB の花を次に定義する発生段階において収穫した。

段階1：着色なし、つぼみが閉じている（長さ < 25mm）

段階2：着色あり、つぼみが閉じている（長さ 25~35mm）

段階3：暗紫色のつぼみ、花冠が生じつつある（長さ > 35mm）

段階4：暗紫色開花、葯裂開前（長さ > 50mm）

段階5：十分に開花、すべての葯裂開

表2に記載する他の品種の花を、最大色素蓄積の段階で葯の開裂前に収穫した。

3', 5' -ヒドロキシラーゼ活性のアッセイのための植物抽出物の調製

植物組織を2~5倍体積の氷冷した抽出緩衝液 (100mM リン酸カリ

葉におけるデルフィニジン合成のグルコース / 高光誘導

葉をP.ハイブリダcv.OGBから収穫し、そして無菌水中で1cm²片に切った。次に、葉片を2% (w/v) グルコース溶液上に浮かせ、そして24,000ルックスの光強度に96時間暴露した。

cDNAライブラリー #1の作製

段階3~4のOGB の花の周囲20gを、10mM バナジルリボヌクレオシド錯体を含有するPEB (200mM Tris-HCl(pH8.6), 60mM KCl, 30mM MgCl₂, 25mM EGTA) 100mL 中でホモゲナライズした。ホモジネートを無菌のMiracloth(Calbiochem) に通して濾過することにより細胞片を除去した。滤液を、Ultra-Clear™ Quick-Seal™ (Beckman) 遠心チューブ中、25% (w/v) シューコロース及び250 ユニットのInhibitAce (5'-Prime 3'-Prime) を含有する8mLのPEB、並びに50% (w/v) シューコロース及び250 ユニットのInhibitAceを含有する6mLのPEBの段階的勾配の上部に重層した。チューブを70Tiローター中で26,000 rpm にて3.5時間遠心した。25% (w/v) シューコロース / 50% (w/v) シューコロース界面から膜結合ポリソームを集め、そして4M イソチオシアニン酸グラニジン溶液に加えた。Turpen及びGriffith (1986) により記載されているようにして5.7M CsCl クラシオンを通してペレット化することによりRNAを変性したポリソームから単離した。

Uni-ZAP™ XR ベクターキット (Stratagene) を用い、錐型としてポリソームRNAを25μg 使用してλZAP中にディレクショナルcDNAライブラリーを作製した。250,000 ブラーカ形成ユニット (pfu) を含有する一次ライブラリーをNZYプレート (Sambrookら, 1989) 上での一夜増殖により増幅し、そして増幅されたファージストックをSambrookら (1989) により記載されているようにしてPSB (100mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 50mM Tris-HCl(pH7.5), 0.001% (w/v) ゼラ

チン) 中に溶出した。

cDNAライブリーエの作製

全RNAを、P.ハイブリダcv.0GBの段階3~4の花の花弁組織から、Turpen及びGriffith (1986) の方法を用いて単離した。ポリ(A)+RNAを前記全RNAから3サイクルのオリゴーdTセルロースクロマトグラフィー (Aviv及びLeder, 1972) により選択した。

2μgのポリ(A)+RNAを、IX Superscript™反応緩衝液、10mMジオオスレイトール、500μM dATP、500μM dGTP、500μM dTTP、500μM 5-メチル-dCTP、0.75μgオリゴヌクレオチド#8及び2μL Superscript™逆転写酵素(BRL)を含む20μL体積中で逆転写した。反応混合物を37°Cにて50分間、44°Cにて10分間インキュベートし、次に氷上に置いた。

第二鎖反応混合物(140μL)を第一鎖反応混合物に加えた。第二鎖反応混合物は21mM Tris-HCl、104mM KCl、5.3mM MgCl₂、171μM β-NAD、11.4mM(NH₄)₂SO₄、214μM dATP、642μM dCTP、214μM dGTP、214μM dTTP、4mM DTT、10μCi³²P-dCTP(3000Ci/mole)、15ユニット大腸菌DNAリガーゼ、40ユニットDNAポリメラーゼ(Boehringer)及び0.8ユニットRNase Hから成了。最終混合物を16°Cにて150分間インキュベートした。2本鎖cDNAを平滑末端化するため、10ユニットのT4 DNAポリメラーゼを加え、そして反応を16°Cにてさらに15分間続けた。反応を停止し、cDNAをフェノール/クロロホルム抽出、そして次にクロロホルム抽出及びエタノール沈殿により精製した。

EcoRIアダプター(Promega)をcDNAに連結し、そして次に製造者により推奨された条件を用いてキナーゼ処理した。加熱(70°C、20分)により酵素を変性させ、そしてフェノール/クロロホルム抽出及びエタノール沈殿によりDNAを抽出した。cDNAを50ユニットのXbaI

(Boehringer)により、100mLの反応体積中で、製造者の推奨する条件を用いて消化した。酵素を加熱失活させ(70°C、20分間)、そして混合物を、STE緩衝液(Sambrookら、1989)中で平衡化されたS400スパンカラム(Pharmacia)に通した。溶出液をフェノール/クロロホルム抽出し、そしてエタノール沈殿させた。4°Cにて30分間のマイクロ遠心分離の後、cDNAペレットを70% (v/v)エタノールで洗浄し、空気乾燥し、そして10μLのTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTA)中に再懸濁した。

そのうち、7.5μLを1% (w/v)アガロースゲルを用いて電気泳動し、1.3~2.5Kbのサイズ範囲のcDNAを単離するためにNA-45膜(Schleicher及びSchuell)を用いた。

サイズ分画されたcDNAを、50mM Tris-HCl(pH7.0)、10mM MgCl₂、10mMジオオスレイトール、1mM ATP及び2ユニットのT4 DNAリガーゼから成る反応緩衝液5μL中で、λ ZAP II EcoRI/XbaI/CIP処理ベクター(Stratagene)1μgと連結した。反応は4°Cにて2日間行った。

室温に2時間置いた後、Packagene系(Promega)を用いて連結反応混合物をパッケージした。粗換体の全数は270,000pfuであった。

150,000pfuの量のパッケージされたcDNAを、PLK-F'細胞のトランスフェクションの後、15cm直径のプレート当たり10,000pfuでプレートした。プレートを37°Cにて8時間インキュベートし、そして4°Cにて一夜貯蔵した。2枚のリフトをColon/Plaque Screen™フィルター(Dupont)上に取り、そして製造者が推奨するように処理した。

オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドを、Applied Biosystems PCR-Mate DNA合成機上で、製造者により推奨される方法を用いて合成した。合成され

たオリゴヌクレオチドは5'-3'の方向に次の通りであった。

オリゴ1 : GGAAGCTTATTCCTT(T/C)GGGCCIGG

オリゴ2 : GGATGACTCAAGTAAACGACCGCCAGT

オリゴ3 : CCIGG(A/G)CAIATIC(G/T)(C/T)(C/T)TICCIIGCICC(A/G)

AAIGG

オリゴ4 : GGATGACTCAAACAGCTATGACCATG

オリゴ5 : GTTCAATTCCGAATGATG

オリゴ6 : GCTGCACTTAATCCATAT

オリゴ7 : TCCATAGCTTTGGG

オリゴ8 : GAGAGAGAGAGAGAGAGATCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTT

オリゴ9 : ATGTCCTCCAGTG

オリゴ10 : CTAGACTCCAATCAC

オリゴ2及び4は、2本鎖PCR生成物の濃縮を促進することができる(Lem及びKemp, 1989) GCN4結合部位(アンダーラインで示してある)を含んだ。

オリゴ3の設計のための基礎は次の通りであった。アボカドのシトクロムP450の想定されるヘム結合ドメインからのアミノ酸配列(Bozakら、1990)及び2つのペチュニアシトクロムP450同族pCGP142及びpCGP147によりコードされる対応する配列を整列させた。

アボカド P F G A G R R G C P G

pCGP142 P F G A G K R I C P G

pCGP147 P F G S G R R I C P G

3つの植物シトクロムP450のヘム結合領域のコンセンサスアミノ酸配列は次の様に見ることができよう。

P F G A (S) G R (K) R I (G) C P G

3種のシトクロムP450分子のヘム結合ドメイン中に見出されるアミノ酸をコードすることができるヌクレオチド配列の可能な順列は

次の様に演えきすることができよう。

5'	-CCX	TTT	GGX	GCX	GGX	AGX	CGX	ATX	TGT	CCX	GGX-	3'
	C	AG	CA	A	GG	C						T

Xは4種類すべてのヌクレオチド(A, C, G及びT)を使用することができるヌクレオチド位置を示す。オリゴ3は、3種の植物シトクロムP450由来するコンセンサス配列のサブセットを相補するよう設計された。塩基の総重が3より大である場合、デオキシリノシン(1)を用いた。得られるオリゴヌクレオチド配列は上に示す通りであった。

PCR反応

ヘルバーファージR408(Stratagene)を用いて、製造者により記載された方法を用いて、200,000pfuの増幅されたλ ZAP cDNAライブルリー#1からペチュニアcDNA挿入部を含有するpBluescriptファージミドを切り出した。大腸菌XL1-Blueをファージミド混合物によりトランスフェクトし、そして250,000コロニーをアンピシリン含有培地上にプレートした。細胞をLB(Sambrookら、1989)に再懸濁し、そしてアルカリ溶解法(Sambrookら、1989)を用いてプラスミドDNAを単離した。CsClグラジェント上でのバンド形成によりプラスミドDNAをさらに精製した。このDNAをPCR用錠型として用いた。

花弁シトクロムP450同族体の増幅のためのPCR反応混合物は5ngから100ngの切り出されたDNA、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.01% (w/v)ゼラチン、0.2mMずつのdNTP、0.4μMずつのプライマー及び1.25ユニットのTaqポリメラーゼ(Cetus)を含有した。反応混合物(50μL)を、94°C、48°C及び72°Cの間で各温度において1分間ずつ、30回循環した。増幅された生成物をGeneclean(Bio 101 Inc.)を用いてゲル精製し、クローニングの

ために十分な量を得るために再増幅し、そして次にT4 DNAポリメラーゼを用いて末端修復した。オリゴ1及び2を用いて増幅したDNAをHindIII及びXbaIで消化した後にpBluescriptにクローニングした。オリゴ3及び4間の増幅により生じたPCT生成物を、Holton及びGraham (1991)により記載されたddT-テイルpBluescriptに直接クローニングした。

cDNAライブラリーのスクリーニング

2枚のブラークリフトを次のようにしてハイブリダイズさせそして洗浄した。高ストリンジェンシー条件(ハイブリダイゼーション: 50% (v/v) ホルムアミド、6xSSC, 1% (w/v) SDS, 42°Cにて16時間、及び洗浄: 2xSSC, 1% (w/v) SDS, 65°Cにて2×15分間、これに続き0.2xSSC, 1% (w/v) SDS, 65°Cにて2×15分間)を用いて兄弟クローンを検出し、そして低ストリンジェンシー条件(ハイブリダイゼーション: 20% (v/v) ホルムアミド、6xSSC, 1% (w/v) SDS, 42°Cにて16時間、及び洗浄: 6xSSC, 1% (w/v) SDS, 65°Cにて1時間)を用いて関連配列を検出した。

ノザン分析

全RNAを、液体N₂中で凍結した組織から単離し、そして乳鉢と乳を用いて微粉砕した。4Mイソチオシアニン酸グアニジン、50mM Tris-HCl(pH8.0)、20mM EDTA、0.1% (v/v) Sarkosylの抽出緩衝液を組織に添加し、そして混合物を最大速度でポリトリロンを用いて1分間ホモジナイズした。懸濁液をMiracloth(Calbiochem)を用いて滤過し、そしてJA20ローター中で10,000rpmにて10分間遠心した。上清を集め、そして0.2g/mL CsCl(v/v)にした。次に、サンプルを、38.5mLのQuick-seal遠心チューブ(Beckman)中で5.7M CsCl、50mM EDTA(pH7.0)の10mLクッション上に重層し、そしてTi-70ローター中で、42,000rpmにて12~16時間23°Cにおいて遠心した。ペレ

ットをTE/SDS (10mM Tris-HCl(pH7.5), 1 mM EDTA, 0.1% (w/v) SDS)中に再懸濁し、そして10mM EDTA(pH7.5)中で飽和されたフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(25:24:1)により抽出した。エタノール沈殿の後、RNAペレットをTE/SDS中に再懸濁した。

RNAサンプルを、2.2Mホルムアルデヒド/1.2% (w/v)アガロースゲルにより、40mMモルホリノプロパンスルホン酸(pH7.0)、5 mM酢酸ナトリウム、0.1 mM EDTA(pH8.0)を含有する泳動緩衝液を用いて電気泳動した。RNAを、製造者が記載するようにHybond-Nフィルター(Amersham)に移行させ、そして³²P-ラベル化cDNA断片(10⁶cpm/μg, 2×10⁶cpm/mL)によりプロープした。プレハイブリダイゼーション(42°Cにて1時間)及びハイブリダイゼーション(42°Cにて16時間)を50% (v/v) ホルムアミド、1M NaCl、1% (w/v) SDS、10% (w/v) 硫酸デキストラン中で行った。ハイブリダイゼーションの段階で、変性したサケ精子DNA(100μg/mL)を³²P-ラベル化プロープと共に加えた。

フィルターを2xSSC/1% (v/v) SDS中で65°Cにて1~2時間洗浄し、そして次に0.2xSSC/1% (v/v) SDS中で65°Cにて0.5~1時間洗浄した。フィルターを、増感スクリーンを用いて-70°Cにて48時間コダックXARフィルムに感光した。

RFLP分析

a. ゲノムDNAの単離

DellaPortaら(1983)が記載したのと実質的に同様にして、葉組織からDNAを単離した。DNA調製物をCsCl浮力密度遠心(Sambrookら、1989)によりさらに精製した。

b. サザンプロット

ゲノムDNA(10μg)を60ユニットのXbaIにより16時間消化し、そ

して0.7% (w/v)アガロースゲルを通して、TAE(40mM Tris-アセテート、50mM EDTA)の泳動緩衝液中で電気泳動した。次に、DNAを変性溶液(1.5M NaCl/0.5M NaOH)中で1~1.5時間変性させ、0.5M Tris-HCl(pH7.5)/1.5M NaCl中で2~3時間中和し、そして次にDNAをHybond N(Amersham)フィルターに20xSSC中で移行させた。

c. chi-A プローブの単離

chi-A(van Tunenら、1988)のcDNAクローンを、PCRにより、OGBの段階3の花弁RNAから作られたcDNA縛型及び2つのオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち公表されたchi-A cDNA配列(van Tunenら、1988)のヌクレオチド6~20をカバーする#9、及びヌクレオチド711-725に対して相補的な#10を用いて合成した。生ずるPCR生成物をpBluescribe M13⁻(Stratagene)のSmaI部位に連結し、そして配列決定して、クローン化された断片が公表された配列に対応することを確認した。

DNAプローブの³²P-ラベル化

DNA断片(50~100ng)を50μCiの(α -³²P)-dCTPにより、オリゴラベル化キット(Bresatec)を用いて放射能ラベルした。取り込まれなかった(α -³²P)-dCTPはSephadex G-50(Fine)カラムのクロマトグラフィーにより除去した。

DNA配列分析

Sangerら(1977)の方法と実質上同様にして、Sequenase酵素(USB、バージョン2.1)を用いてDNA配列決定を行った。クローンpCGP602、pCGP176及びpCGP175の完全な配列を、標準的クローニング方法(Sambrookら、1989)を用いて得られた異なるM13-mp18及び-mp19(Norranderら、1983; Yanish-Perron, 1985)サブクローンからの配列の纏集により決定した。幾つかの領域については、オーバーラップする配列データーを掉るために特定のオリゴヌクレオチ

ドプライマーを合成する必要があった。この目的のために、次の6種のプライマーを合成した。

5'	CGTGCCAATGAGCTAGG	3'	プライマー配列1
5'	GATGTTGGTTGTACTGAG	3'	プライマー配列2
5'	GGAAACAGATTCTTG	3'	プライマー配列3
5'	TTTTTTTTTTTTTTT(AGC)	3'	プライマー配列4
5'	GTTTCCCAGTCACGAC	3'	プライマー-40
5'	AACAGCTATGACCATG	3'	逆プライマー

これらの配列の幾つかの位置を示すpCGP602の制限地図は図8に見られる。

Genbank SWISS-PROT及びEMBLデータベースに対する相同性の検索を、FASTA及びFASTAプログラム(Pearson及びLipman, 1988)を用いて実施した。

pCGP293の作製

発現バイナリー(binary)ベクターpCGP293は、TiバイナリーベクターpCGN1559(McBride及びSummerfelt, 1990)から誘導された。プラスミドpCGN1559をKpnIで消化し、そして突出する3'一末端を標準的方法(Sambrookら、1989)に行ってT4DNAポリメラーゼにより除去した。次に、ベクターをXbaIによりさらに消化し、そして生ずる5'突出部をDNAポリメラーゼIのKlenow断片を用いて修復した。次に、ベクターを再連結してpCGP67を得た。Macプロモーター、ノス・ターミネーター及び種々のクローニング部位を有する1.97kb PstI断片(Comaiら、1990)をpCGP40から単離し、そしてpCGP67のPstI部位に挿入してpCGP293を得た。

pCGN7334からGUS遺伝子(Jeffersonら、1987)をBamHI-SacI断片として取り出し、そしてそれを、多クローニング部位を含むpBluescribe M13⁻からのBamHI-SacI断片で置き換えることにより

プラスミドpCGP40を作製した。Mac-GUS-mas 遺伝子融合体を含有する断片をpCGN7329 (Comaiら、1990) のXbaI部位に挿入することにより、プラスミドpCGN7334 (Calgene, Inc. (CA), 米国) を作製した。

pCGP90の作製

pCGP602からのcDNA挿入部をpCGP293のMacプロモーター (Comaiら、1990) の後にセンス方向にクローニングすることによりプラスミドpCGP90を作製した。cDNA挿入部を含有するBamHI-KpnI断片をpCGP602から単離し、そしてpCGP293のBamHI-KpnI消化物と連結した。pCGP90中の挿入部の正しい挿入を、ゲンタマイシン耐性形質転換体から単離したDNAの制限酵素分析により達成した。

酵母発現ベクターpYGA22mの作製

M13-mp18をEcoRI及びBglIIにより消化して、マルチクローニング部位を含む700bp断片を生成させた。この断片をpYGA2269 (Ashikariら、1989) からの9Kb EcoRI-BglII断片と連結した。pYGA22mと称する得られた構成は、酵母グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼプロモーターの下流に挿入されたマルチクローニング部位を含んでいた (図11)。

pCGP618の作製

pCGP175からの全部のcDNA挿入部を含有する1.8Kb EcoRI-KpnI断片をpYGA22mからの9Kb EcoRI-KpnI断片と連結した。生ずるプラスミドpCGP618は、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの後にセンス方向に連結されたpCGP175 cDNA断片を含んでいた (図11)。

pCGP620の作製

pCGP176からの完全なcDNA挿入部を含有する1.8KbのEcoRI-KpnI断片を、pYGA22m(pCGP618の作製について記載したように)からの

9KbのEcoRI-KpnI断片と連結した。得られるプラスミドpCGP620は、酵母グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの後にセンス方向に連結されたpCGP176 cDNA断片を含んでいた。

酵母の形質転換

酵母G-1315株 (Mat α, trp1) (Ashikariら、1989) をItoら (1983) に従って、pCGP618及びpCGP620により形質転換した。形質転換体を、G-1315をトリプトファン自律合成性 (prototrophy) に回復させるそれらの能力により選択した。

3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性のアッセイのための酵母抽出物の調製

a. G-1315/pCGP618

トリプトファンを欠く培地上に増殖したG-1315/pCGP618及びG-1315復帰変異株の单一单離体を用いて50mLのYNBC (アミノ酸不含酵母ナイトロジエンベース (Difco) 1.2% (w/v), 2% (w/v) ゲルコース及び0.3% (w/v) カザミノ酸 (Difco)) に接種し、そして30°Cにて2日間振とうしながらインキュベートした。細胞を遠心によりペレット化し、そしてミクロソーム画分をOedaら (1985) に従って得たが、但し植物組織中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性のアッセイのために使用される抽出緩衝液中でスフェロプラストを破碎した。ミクロソームペレットを400 μLの緩衝液A (10mM Tris-HCl (pH7.5), 0.65Mソルビトール, 0.1 mM DTT, 0.1mM EDTA) 中に懸濁し、そして100 μLのサンプルを3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性についてアッセイした。

b. G-1315/pCGP620

G-1315/pCGP620の单一单離体を用いて20mLのYNBCに接種し、次にこれを2日間30°Cにてインキュベートした。細胞を遠心分離により集め、TEにより1回及び緩衝液Aにより1回洗浄し、そして次

にザイモリーアーゼ100T (0.1mg/mL) (生化学工業) を含有する緩衝液B (10mM Tris-HCl (pH7.5), 1.2Mソルビトール, 0.1 mM DTT, 0.1mM EDTA) 中に再懸濁した。30°Cにて1時間のインキュベーションの後、細胞を遠心分離によりペレット化し、そして400 μLの緩衝液A中に再懸濁した。次に、細胞懸濁液をガラスピース (直径0.4mm)と共に2分間ポルテックスし、そして100 μLのサンプルを3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性についてアッセイした。

ペチュニアの形質転換

a. 植物材料

ペチュニア・ハイブリダ (Skr4 x Sw63, 及びRp57 x Rw14) の種子を1.25% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム中で10分間殺菌し、そして無菌水中で3回洗浄した。殺菌された種子を100mg/Lのジベレリン酸 (GA₄) 溶液に16~20時間浸漬した。次に、これらを、1% (v/v) シュークロース及び0.8% (w/v) ディフコ (Difco) バクトアガーを補充した10% (w/v) MS (Murashige及びSkooy, 1962) 上で2週間発芽させた。

若い実生を、3% (w/v) シュークロースが補充されたMS培地に3週間移し、次にジフィー・ピート (Jiffy peat) ベレット (Jiffy Products Ltd. ノルウェイ) に移し、高湿度のもとに保持し、そして2~3週間光照射した (135 μE, 塩化水銀灯22°C)。次に、これらの若植物を成育キャビネット (68μE, 冷白色蛍光灯, 25°C)。同時培養 (co-cultivation) のため、若い葉を収穫し、そして1.35% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム中で2分間殺菌し、次に無菌水中で3回洗浄した。次に葉組織を25mm²の正方形に切断し、そして0.05mg/Lのカイネチシン及び1.0mg/Lの2, 4-ジクロロフェノキシ酢酸 (2, 4-D) を補充したMS培地上で24時間前培養した。

b. アグロバクテリウムとペチュニア組織との共存培養

バイナリーベクターpCGP90 (図14) を含むアグロバクテリウム・ツメファシエンス AGL0 (Lazoら、1991) を4°Cにて、100mg/Lのゲンタマイシンを含有するMG/L (Garfinkel及びNester, 1980) 寒天プレート上に保持した。1% (w/v) ベクト・ペプトン、0.5% (w/v) ベクト酵母エキス及び1% (w/v) NaClを含有する液体培地中で单一コロニーを一夜増殖させた。次の日、3% (w/v) シュークロースを含有する液体MS培地 (BPM) 中への希釈により5×10⁴細胞/mLの最終濃度を調製した。葉のディスクを、AGL0/pCGP90を含有するBPM中に浸漬した。次に葉のディスクを紙の上で乾燥し、そして共存培養培地上に4日間置いた。共存培養培地は、0.05mg/Lのカイネチシン及び1.0mg/Lの2, 4-Dが補充されたSH (Schenk及びHildebrandt, 1972) から成り、そして共存培養培地に一面に並がったタバコ細胞懸濁物のフィーダー層及びそのタバコ細胞懸濁物の上に置かれた滤紙を含んでいた。

c. トランジェニックペチュニア植物の再生

共存培養の後、葉組織を次の選択培地に移した：Skr4 x Sw63のディスクは、3% (w/v) シュークロース、2mg/Lのα-ベンジルアミノブリジン (BAP), 100 mg/Lカナマイシン, 350 mg/Lセファタキシム (cefotaxime) 及び0.3% (w/v) ゼライト・ゼラン・ガム (Gelrite Gellan Gum) (スイス) を補充された新鮮なMS培地へ；Rp57 x Rw14のディスクは、2mg/LのBAPの代りに0.5mg/LのBAP及びα-ナフタレン酢酸 (NAA) を含有する同じ培地に。3週間後、再生しつつある外植片を新鮮な培地に移した。カナマイシン選択に対して生き残った不定芽を、根の誘導のため、100 mg/Lカナマイシン及び350 mg/Lセファタキシムを含有するBPMに移した。すべての培養物を16時間照射 (60μE, 冷白色蛍光灯) のもとで23±2°Cに

保持した。根が2～3cmの長さに達した時、トランスジェニックペチュニア植物を、8cmのチューブ中のオートクレーブ殺菌されたDebco 51410/2 ポットミックスに移した。4週間後、植物を同じポットミックスを用いる15cmのポットに再移植し、そして14時間照射(300 μE、ハロゲン化水銀灯)のもとで23°Cにて保持した。

タバコの形質転換

a. 植物材料

ニコチアナ・タバコ (*Nicotiana tabacum*) (cv. Xanthi)ストック植物は、1mg/Lのインドール酢酸 (IBA)が補充されそして0.25% (w/v)ゲルライト (Gelrite)に上り固化されたMS培地上に維持した。葉の組織を25cmの正方形に切断し、そして1mg/LのBAP及び0.5mg/Lのインドール酢酸 (IAA)を含有するMS培地に24時間置いた。

b. アグロバクテリウムとタバコ組織との共存培養

ペチュニアについて前記したようにして共存培養を行った。

c. トランスジェニックタバコ植物の再生

共存培養の後、葉のディスクを、1mg/LのBAP、0.5mg/LのIAA、100mg/Lのカナマイシン及び350mg/Lのセファタキシムが補充されたMS培地(選択培地)に移した。2～3週間後、再生しつつある外植片を新鮮な選択培地に移した。カナマイシン選択に対して生き残った不定芽を単離し、そして根の誘導のため、1mg/LのIBA、100mg/Lのカナマイシン及び350mg/Lのセファタキシムを含有するMS培地に移した。根が2～3cmの長さに達した時、ペチュニアについて記載したようにして、トランスジェニックタバコ植物を土壌に移植した。

カラム温度：35°C

検出：280, 350 及び546nmでの同時データー取得によるWWD
アントシアニンのピークは既知標準との比較により同定した。

2. 3', 5'-ヒドロキシラーゼのクローニング及び分析

3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素の特性決定

a. 発生段階による制御 (Developmental Regulation)

前に定義した発達の異なる段階における花から収穫したP.ハイブリダcv. OGBの花弁の抽出物を3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性について測定した。

OGBの花弁中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素活性は花冠の成熟の間に発生段階による制御がされることが見出された(図2B)。この発生的プロフィールはフラボノイド生合成に関与する他の遺伝子の発現と平行した。3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素の活性、並びにカルコン(chalcone)シンサーゼ(CHS)、カルコンフラバンノイソメラーゼ(CHI)及びジヒドロフラボノールレダクターゼ(DPR)遺伝子の発現は花の発達の段階3～4付近でピークとなった。

b. 葉組織における3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性の誘導

フラボノイド色素生合成経路の遺伝子は通常は葉組織中では発現されない。しかしながら、デルフィニジン色素の合成はOGBの葉において、2% (w/v)グルコース溶液中強い光のもとでのインキュベーションにより誘導された。これらの条件下で、3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素活性がOGB葉組織中で検出される。酵素活性の最大誘導が96時間のグルコース/高光処理の後に起こることが示された。これらの条件下で、幾つかの他の色素生合成遺伝子の発現も、発生中の花弁中に観察されるレベルに匹敵するレベルに誘導された。これらの結果から、Hf1及び/Hf2遺伝子がグルコース/高光処理された葉組織において誘導されると結論された。

アントシアニンの分析

HPLC分析に先立って、花弁抽出物中に存在するアントシアニン分子を酸加水分解して、アントシアニン核からグリコシル成分を除去した。アントシアニン色素のB環でのヒドロキシル化パターンをアントシアニン核分子のHPLC分析により決定した。この分析において使用したHPLC系は多波長検出器 (WWD)を備えたHewlett-Packard 1050であった。Spherisorb S5 ODS2カラム250 mm × 4 mm ID上で逆層クロマトグラフ分離を行った。

a. アントシアニン及びフラボノイドの抽出

花の色素を、花弁の断片(約50mg)から、1% (v/v)の水性6M塩酸を含有するメタノール 5 mlにより抽出した。抽出物を水で希釈し(1:9)、そして滤過した(Millex HV, 0.45 μ)後にHPLC系に注射した。

b. アントシアニンの加水分解

前記a.において得た根メタノール抽出物(100 μL)を室温にて乾燥空素流を用いて Pierce Reacti-Vials 中で蒸発乾固した。残渣を200 μLの2M HClに溶解し、バイアルにキャップを付し、そして次に100 °Cにて30分間加熱した。加水分解混合物を水(1:9)で希釈し、そしてHPLC分析に先立って滤過した(Millex HV, 0.45 μ)。

c. クロマトグラフィー

花の色素の分離は、次の系を用いるゲラジェント溶出により行った。

溶剤A：(トリエチルアミン：濃硫酸:H₂O) (3:2.5:1000)

溶剤B：アセトニトリル

ゲラジェント条件：20分間にわたり5% Bから40% Bへ

流速：1 ml/分

c. 3', 5'-ヒドロキシラーゼがシトクロムP450クラスの酵素に属することの証明

OCB花弁中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性はミクロソーム画分に関連しており、そしてNADPHの存在に依存することが示された。活性は、一酸化炭素によるミクロソームの処理により、及びシトクロムP450酵素を特異的に不活性化する2種類の阻害前、テトライクリアシス(tetacyclasis)及び1-アミノベンゾトリアシン(Tatonら、1988; Matthewsら、1985; Rademacherら、1987)、により阻害されることができた。

シトクロムP450配列について濃縮されたcDNAライブラリーの作製

シトクロムP450 mRNAの翻訳は膜結合ポリソームにおいて起こる(Takemori及びKomimami, 1989)。従って、シトクロムP450配列(3', 5'-ヒドロキシラーゼ配列を含む)について濃縮するため、段階3～4の花のOGBの花弁から単離された膜結合ポリソームRNAを用いてcDNAライブラリーを作製した。段階3～4の花からの花弁のRNAの単離により、3', 5'-ヒドロキシラーゼ配列がこのライブラリーにおいて最高に代表されることが保証された。なぜなら、3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性は発生のこの段階において最大であることが示されたからである(前記及び図2Bを参照のこと)。cDNAライブラリーと称する得られたライブラリーは250,000の一次組換体を含んでいた。

ペチュニアの花弁シトクロムP450 cDNAのPCR増幅

多数のシトクロムP450が、脊椎動物、菌類、昆虫、細菌及び1種の植物(Nebertら、1991; Bozakら、1990)と、多様な生物体から配列決定されている。これらすべての酵素の特徴は、特にヘム結合に関与するシステイン残基付近での、多数の小さな配列保存領域の存在である。今日までに配列決定されているほとんどすべてのミク

ロソーム由来シトクロムP450のヘム結合ドメインにアミノ酸配列 P(G,S)XGXRXCXGが存在し、ここでXはいずれのアミノ酸であってもよい(図3)。このコンセンサス配列をPASTAプログラム(Pearson及びLipman, 1988)を用いてNBRF蛋白質データベースと比較することにより、データベース中のすべてのミクロソーム性シトクロムP450配列についてこの領域付近のアミノ酸の存在頻度を決定した。この分析が示すところによれば、ヘム結合ドメイン付近の各位置の最も共通なアミノ酸配列は：

FMPFGAGXRXCGLG

アンダーラインを付した配列及び類似の配列をコードする遺伝子にハイブリダイズするようにオリゴヌクレオチドを設計した。オリゴ1と称するこのオリゴヌクレオチドを下に示す。

5' - **GGAGCTTATICCITT(T/C)GGIGCIGG** - 3'

アンダーラインを付した部分は、PCR生成物の方向性クローニングを促進するためのHindIII認識部位を含む追加の配列である。デオキシイノシン(I)を含めることにより、2以上のコドンが同一のアミノ酸配列をコードし得るようなコドンの使用の異なる可能性がカバーされた。デオキシイノシンは類似の効率でA, T, G及びCに塩基対合する(Martinら, 1985; Ohtsukaら, 1985)。

「材料及び方法」の項に記載したようにしてcDNAライブラリー#1から得られたプラスミドDNAを、オリゴ1及び2を用いての360bpのシトクロムP450関連配列の増幅のための錠型として使用した(図3)。オリゴ2は-20プライマー(Stratogene)の5' -末端にGCN4結合部位(Lew及びKemp, 1989)を付加したものに対応する。PCR断片をpBluescriptにクローニングし、そして生ずるプラスミドをpCGP450と称した。pCGP450の5' -領域はすでに配列決定されているシトクロムP450分子に対して有意に相容性を有するポリベ

プチド配列をコードする。

ペチュニアの花弁cDNAライブラリーからのシトクロムP450同族体の単離

プラスミドpCGP450を用いて、関連クローンについてcDNAライブラリー#1(60,000プランク)をスクリーニングした。高ストリンジエンシー及び低ストリンジエンシーの条件下での2つの引続くハイブリダイゼーションを用いて、pCGP450の兄弟クローン及びシトクロムP450cDNAの第二グループの両者を検出した。兄弟群のそれぞれの代表的cDNAクローンを次の段階の分析のために選択した。pCGP450の兄弟クローンをpCGP142と命名し、そして第二グループの代表をpCGP147と命名した。次に、pCGP147のコード配列のみを含むSalI-EcoRI断片を用いてcDNAライブラリー#1からの16,000プランクを低ストリンジエンシーにおいて再プローブした。このプローブとハイブリダイズする合計20クローンを配列決定し、さらに2つのシトクロムP450同族体pCGP158及びpCGP160を同定することができた(図4A)。

追加の花弁シトクロムP450同族体のPCRによる単離

ペチュニアのクローンpCGP142及びpCGP147並びにすでに配列決定されているアボカドのシトクロムP450配列(O'Keefe及びLeto, 1989; Zozakら, 1990)の推定上のヘム結合ドメイン付近からの配列情報を「材料及び方法」の項に記載したと同様にして用いて、前記3つのシトクロムP450クローンの少なくとも2つによりコードされるアミノ酸配列をカバーする第二の縮重オリゴヌクレオチド(オリゴ3)を設計した。このオリゴヌクレオチドを用い、そして錠型としてのcDNAライブラリー#1及び第二プライマーとしてのオリゴ4を用いて、PCRにより関連配列を増幅した(図3B)。サイズ範囲250~500bpの反応生成物を「材料及び方法」の項に記載したよ

うにして単離し、そしてHolton及びGraham(1991)により記載されたddTを付加したpBluescriptベクターにクローン化した。クローン化されたPCR断片を配列決定し、第五のシトクロムP450同族体をコードすることが示された。pCGP454と称する1つのクローンを更なる分析のために選択した。

cDNAライブラリー#1からの更なるシトクロムP450同族体の単離

シトクロムP450同族体pCGP142, pCGP147, pCGP158及びpCGP160のコード領域並びにpCGP454からのcDNA(図4B~4H)を含む³²Pラベル化DNA断片の混合プローブを用いて、関連配列のために、cDNAライブラリー#1から50,000個のクローンをスクリーニングした。低ハイブリダイゼーション及び洗浄条件下で合計152個のハイブリダイズするクローンが検出された。ハイブリダイズするクローンから単離されたDNAの配列分析により更なる13の異なるシトクロムP450同族体が同定された。これらのクローン間で2つの密接に関連する兄弟群が区別された。これら2群のそれぞれのコード領域はDNAレベルで94%の相容性又は類似性を示した。1つの兄弟群の2つの代表pCGP174(図5A)及びpCGP176、並びに他の兄弟群の1つの代表pCGP175(図5B)を更なる研究のために選択した。

シトクロムP450同族体のナサン及びRFLP分析

3', 5' -ヒドロキシラーゼをコードするcDNAの分子的特徴を有するシトクロムP450同族体区別するためにナサン及びRFLP分析を用いた。P.ハイブリダには3', 5' -ヒドロキシラーゼ活性を制御する2つの遺伝子座Hf1及びHf2が存在する(de Vlaeminckら, 1984; Wiering, 1974)。Hf1はP.ハイブリダの花の周及び管の両方において発現され、そして周縁のみで発現されるHf2に比べて非常に高いレベルの3', 5' -ヒドロキシラーゼ活性をもたらす。ペチュニアの3', 5' -ヒドロキシラーゼ活性も発現的且つ空間

的に制御される。通常の成育条件のもとで、この酵素は花弁組織においてのみ検出でき、花の発達段階の段階3~4付近で最高レベルに増加しそして十分に開いた花において低下する(段階5:図2(B)を参照のこと)。活性はまた、ある種のストレス条件、例えば前記のグルコース/高光処理のもとで葉組織においても誘導される。従って、3', 5' -ヒドロキシラーゼをコードするcDNAクローンは、酵素活性プロフィールと平行するRNAプロット上の発現プロフィールを有すると予想された。さらに、P.ハイブリダの3', 5' -ヒドロキシラーゼをコードするcDNAはクローンはHf1又はHf2のいずれかに位置すると予想された。Hf1はP.ハイブリダのゲノムの染色体Iにマップされており、そしてPh1遺伝子座に連鎖している(Cornu, 1984; Cornuら, 1990)が、Hf2は染色体V上のPoに密接に連鎖している(Wallrothら, 1986)。純系V23(Hf1/Hf1, Hf2/Hf2)とR51(hf1/hf1, hf2/hf2)との交配に由来する植物のF₁代から単離されたDNAのRFLP分析を用いて、種々のシトクロムP450同族体についての連鎖データーを得た。Hf1/-遺伝子型は花の管に3', 5' -ヒドロキシラーゼ活性を有するP₁植物に帰属された。さらに、花弁の液胞のpHに影響を与えるPh遺伝子への連鎖に基いて、Hf1/Hf1遺伝子型をF₁集団の植物に帰属させることができた(Wiering及びde Vlaeminck, 1984)。

V23親系(Hf1/Hf1)はまた約6.2の花弁ホモジネートpHをもたらすPh1/Ph1遺伝子型を有していた。Ph1/-植物は5.3の花弁ホモジネートpHを有するので、花弁ホモジネートのpHを測定することによりR51 x V23 F₁集団内のPh1/Ph1(Hf1/Hf1)植物を区別することができた。

Hf2及びPo遺伝子座間の連鎖を用いて、候補Hf2クローンを区別

した。Po座は、酵素カルコンフラバノンイソメラーゼをコードするP.ハイブリダchiA遺伝子に対応することが示されている(van Tunenら、1991)。従って、chiAのcDNAクローンは、P₁集団中の個体にPo又はPo遺伝子型を帰属させるためのRFLP分析において使用することができた。V23はHf2/Hf2。Po/Po遺伝子型を有するので、chiAプローブにより検出されるV23様及びR51様RFLPパターンとPo及びPoパターンとの同時分離(co-segregation)によりHf2遺伝子座への連鎖を決定することができた。

シトクロムP450同族体の3' - 非翻訳領域に対応するcDNA断片を使用して、V23 x R51P₁集団中の個々の植物から単離されたゲノムDNAのサザンプロット及びRNAプロットをプローブした。この分析により、cDNAクローンpCGP174及びpCGP175に対応する遺伝子が3'，5' - ヒドロキシラーゼ活性に平行する型様で発現されたことが示された。さらに、pCGP174に対応する遺伝子はHf1遺伝子座に密接に関連しており、そしてpCGP175はHf2遺伝子座に関連していることが示された。

a. pCGP174

クローンpCGP174(図5A)からの330bpのHindIII - KpnI 3' - 断片はRNA及びDNAの両プロット上のハイブリダイゼーションのパターンを与え、このパターンはこのクローンがHf1遺伝子座に対応することを示した(図6)。この遺伝子は周縁組織及び管組織の両方で発現され、そして3'，5' - ヒドロキシラーゼ活性と平行する急速プロフィールを有し、段階3の花弁周縁にピークを示した。案においては発現は観察されなかったが、この組織においてグルコース／高光処理により誘導された。さらに、Hf1/Hf1変異系R51及びSw63の花弁組織中に遺伝子の検出可能な発現は存在しなかった。これに対して、Hf1/Hf1系V23及びTh7並びにV23 x R51雑種にお

いては高レベルの発現が観察された(Fig.6A)。

XbaIにより消化されたゲノムDNAのサザンプロットにおいて、pCGP174からの330bpのHindIII - KpnI 3' - 断片は、V23 x R51 P₁集団において独立に分離する(segregate)2つのRFLPを検出した。RFLP#1は強くハイブリダイズするDNAバンドに対応し、他方RFLP#2は弱くハイブリダイズするバンドに対応した(図6Bを参照のこと)。ph1/ph1遺伝子型に帰属された12の植物の11がRFLP#1についてV23様パターンを有し、そして管において3'，5' - ヒドロキシラーゼ活性を有する49の植物の内49がRFLP#1についてV23又はVR様パターンのいずれかを有していた。さらに、全32の植物について、chiA(Po)についてのV23, VR及びR51 RFLPパターンとRFLP#2の対応するパターンとの完全な同時分離(co-segregation)が存在した。

これらのデーターは、pCGP174が3'，5' - ヒドロキシラーゼをコードしておりそしてHf1遺伝子座(RFLP#1)に対応すること、及び3' - プローブがHf2遺伝子座(RFLP#2)にクロスハイブリダイズすることの強力な証拠を提供した。

b. pCGP175

クローンpCGP175(図5B)からの320bpのHindIII - XbaI 3' - 断片はRNA及びDNAプロットの両者上のハイブリダイゼーションのパターンを与え、このパターンはこのクローンがHf2遺伝子座に対応することを示唆した(図7)。ノザン分析が示すところによれば、この遺伝子はpCGP174と同様に発生的に制御され、段階3のOGB花弁周縁において最大の発現を示すが、OGBの管組織においては発現は観察されなかった。この遺伝子はまた、V23(Hf2/Hf2), Th7(Hf2/Hf2)、及びV23 x R51雑種の花弁組織中でも発現された(図7A)。

サザンプロットにおいて、pCGP175からの320bp HindIII / XbaI断

片は、pCGP174の3'側プローブ(RFLP#2)に弱くハイブリダイズするV23及びR51ゲノムDNAのXbaI消化により生成した同じゲノム断片にハイブリダイズした。pCGP175の3'側プローブにより検出されるV23, VR及びR51様RFLPパターン並びにchiA(Po)についての対応するRFLPパターンの完全な同時分離(co-segregation)が存在した。

次に発現実験(下記参照のこと)は、pCGP175及びpCGP174の兄弟(pCGP176)の両者が3'，5' - ヒドロキシラーゼをコードしていることを確認した。さらに、Hf1/Hf1, Hf2/Hf2ペチュニアの変異株におけるpCGP174の完全長バージョンの発現は増加した3'，5' - ヒドロキシラーゼ活性、及び非トランスジェニック植物において通常見出される低い基底レベルを上回る3'，5' - ヒドロキシル化アントシアニンの生産をもたらした。RFLPの結果と相まって、これらのデーターから、pCGP174がHf1遺伝子座に対応し、そしてpCGP175がHf2遺伝子座に対応することが結論された。

完全長Hf1 cDNAクローンの単離及び配列分析

予備的配列分析から、pCGP174は対応する転写物の完全長クローンを代表せず、pCGP175が推定上の開始コドンを含み、そして完全なcDNAであると推定された。配列分析はさらに、pCGP176はpCGP174の一層長いバージョンであって、5' - 末端から176bpにATGコドンを含有することを示した。しかしながら、この分析のみからは、pCGP176がこの遺伝子の全コード領域を含有するか否かを確信して予想することは不可能であった。行って、pCGP174/pCGP176兄弟群の一層長いクローンについて、cDNAライブラリー#2をスクリーニングした。cDNAライブラリー#2からの約1.5 × 10⁶個の粗換体を、pCGP174からの0.33kb HindIII - KpnI 3' - 断片にハイブリダイズするクローンについてスクリーニングした。pCGP601及びpCGP602

と称するハイブリダイズするクローンを、更なる分析のために選択した。pCGP601及びpCGP602の両者は推定上の翻訳開始コドンを含んでいたが、pCGP602はより長い5' - 非翻訳領域を含んでいた。

クローンの配列決定のために適合された方法及びオーバーラップする配列情報を得るために使用されたオリゴヌクレオチドプライマー配列を示すpCGP602の制限酵素地図を図8に示す。

兄弟株pCGP176及びpCGP602のヌクレオチド配列及び推定されるアミノ酸配列を図9に示す。同様に、図10はpCGP175のヌクレオチド配列及び推定される翻訳生成物を示す。

LFASTAプログラム(Pearson及びLipman, 1988)により生ずる整列を用いて、ペチュニアの3'，5' - ヒドロキシラーゼ遺伝子によりコードされるアミノ酸配列は94%の位置的同一性を共有することが見出された。ヌクレオチド配列は94%同一であった。シトクロムP450の分類方式に基いて、この配列の類似性は両遺伝子を同じファミリー/サブファミリーに置いた。3'，5' - ヒドロキシラーゼのアミノ酸配列はシトクロムP450スーパーファミリーのすでに特性決定された構成員のいずれとも40%未満の同一性を共有するので、対応する遺伝子は、他のすべてのP450遺伝子とは別の新しいP450ファミリーに属する。

酵母におけるpCGP175 cDNAの発現

pCGP175からのcDNA挿入部を酵母ベクターpYGA22m中のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの後にセンス方向に連結した。pCGP618(図11)と称する得られた構成物を酵母G-1315株(Ashikariら、1989)に形質転換した。単一形質転換体を50mLのYNBC中で30℃にて2日間増殖させた。この培養物から調製したミクロソーム画分は3'，5' - ヒドロキシラーゼ活性を有することが示されたが、非形質転換酵母から調製された同等の画分は

特表平6-500239 (16)

活性を有しなかった(図12)。このことから、pCCP175からのcDNA挿入部は3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードしていると結論された。

酵母におけるpCCP176 cDNAの発現

pCCP176からのcDNA挿入部を酵母ベクターpYGA22m中のグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼプロモーターの後にセンス方向に連結した。pCCP620と称する得られた構成物を酵母G-1315株に形質転換した。形質転換された酵母から調製された抽出物は3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性を有するが、非形質転換酵母から調製された同等の画分は活性を有しないことが示された(図13)。このことから、pCCP176からのcDNA挿入部は3', 5'-ヒドロキシラーゼをコードしていることが結論された。

Hf1 cDNAの発現

a. hf1/hf1, hf2/hf2 P. ハイブリダP₁雜種Skr4 x Sw63における発現

pCCP602のcDNA挿入部をTi-バイナリーベクターpCCP293のMacプロモーターの後に連結した。pCCP90(図14)と称する得られた構成物を、アグロバクテリウム介在遺伝子移送を用いてP₁ペチュニア雜種Skr4 x Sw63に導入した。Skr4 x Sw63の葉ディスクをAGLO/pCCP90と共に同時培養し、そしてSkr4 x Sw63ゲノムへのpCCP602cDNA挿入部の組み込みを、カナマイシン選択後に得られた植物のサンプル分析により確認した。

トランスジェニック植物は、非トランスジェニックSkr4 x Sw63雜種よりも有意に高いレベルの3', 5'-ヒドロキシラーゼ酵素活性(図15)及び3', 5'-ヒドロキシル化アントシアニン(表3A)の両方を有していた。Skr4 x Sw63はhf1遺伝子及びhf2遺伝子の両方についてホモ接合性劣性であるが、低レベルの3', 5'

-ヒドロキシラーゼ活性がSkr4 x Sw63の花弁抽出物において検出されるので(図15)、これらの変異は酵素生産を完全にはブロックしない。さらに、酸加水分解されたSkr4 x Sw63の花弁抽出物において低レベル(100 μg/g)のマルビジン(malvinin)が検出された(表3A)。Hf1cDNAの導入が花弁周辺組織中の3', 5'-ヒドロキシラーゼ活性のレベルを増加させ(図15)、そしてトランスジェニック植物からの花弁の酸加水分解された抽出物は、非トランスジェニック対照において検出されたマルビジンの4倍のレベルを有していた。

b. ニコチアナ・タバコ・カルチバー・キサンシ(*Nicotiana tabacum cultiva Xanthi*)での発現

タバコ(*N. tabacum cv Xanthi*)の花は、唯一のアントシアニンとしてシアニジンを生産する。pCCP90によるタバコの形質転換は、シアニジンに加えて有意量のデルフィニジンの蓄積を導いた(表3A)。

表3 A
色素分析

Anthocyanidin levels found in acid hydrolysed petal extracts
加水分解された花弁抽出物中に見出されるアントシアニンのレベル

植物	マルビジン (μg/g花弁)	シアニジン (μg/g花弁)	デルフィニジン (μg/g花弁)
ペチュニア			
Skr4 x Sw63	100	nd ¹	nd
Skr4 x Sw63/pCCP90	410	nd	nd
タバコ			
非同時培養対照	nd	272	nd
Transgenic tobacco	nd	229	36
トランスジェニックタバコ			

検出されず。

c. hf1/hf1, hf2/hf2 P. ハイブリダP₁雜種Rp57 x Rwl4における発現

pCCP90、及びSkr4 x Sw63について使用したのに類似する方法を用いて、ペチュニアRp57 x Rwl4系を形質転換した。トランスジェニック花はかなりの量のペチュニン及びマルビジンを生産し、これらは非形質転換植物中では検出されなかった(表3B)。ペチュニ

ジン及びマルビジンはいずれもデルフィニジンのメチル化誘導体である。

表3 B
高pH系Rp57 x Rwl4の色素分析

酸加水分解された花弁抽出物中に見出されるアントシアニンの%

植物	シアニジン (%)	ペオニジン (%)	ペチュニジン (%)	マルビジン (%)
ペチュニア				
Rp57 x Rwl4	5.0	95.0	0	0
Rp57 x Rwl4 /pCCP90	0	45.2	7.8	47.0

導入されたhf1cDNAのSkr4 x Sw63雜種における発現は花の色に顕著な効果を有した。非トランスジェニック花の雄ずい葉及び雄ずい組織が白いが、トランスジェニック植物の同じ組織は青/紫色であった。さらに、Skr4 x Sw63雜種におけるhf1cDNAの発現は、通常は非常に淡いピンクである花冠深いピンク/スマレ色の色合いを与えた。タバコの場合、デルフィニン誘導体の生産は老化つある花をわずかに青くした。Rp57 x Rwl4雜種におけるhf1cDNAの発現はやはり花の色に顕著な効果を有した。非トランスジェニックRp57 x Rwl4の花はピンクであり、主たるアントシアニンであるペオニジンが存在した(表3Bを参照のこと)。hf1cDNAによる形質転換は花の色を顕著に青くした。

観察される色の変化はまた、Royal Horticultural Society's Color Chartからの番号として記載することができる。一般に、実

化は色を60C/D-65C/D の淡青～中間ピンク色調から、70と85の間のカラースケールのすべてではないが多くによって代表される暗青／紫色調に動かすものとして記載することができる。達成され得る可能な色の変化を限定することは望まないが、Skr4 x Sw63 種類において観察される色の幾つかは、65B(非形質転換) から70B 及び74B (いずれも形質転換されている) への変化を有するものとして記載することができよう。同様に、Rp57 x Rv14 種類における幾つかは64C から72B, 77B 及び82B に動くものとして記載することができよう。他の生化学的及び生理学的条件が個々の結果に影響を与えるであろうこと、及び達成される特定の色への普及可能な範囲を定義するものと解釈すべきでないことを記憶すべきである。

他の植物種における推定上の 3', 5' -ヒドロキシラーゼ遺伝子配列の検出

3', 4', 5' -ヒドロキシル化フラボノイドの存在は 3', 5' -ヒドロキシラーゼ活性、そしてそれ故に 3', 5' -ヒドロキシラーゼ遺伝子間に関連する。他の種からのこれらの遺伝子は低ストリンジンシー条件下でペチュニアの 3', 5' -ヒドロキシラーゼ遺伝子とハイブリダイズするであろう。RNA(図16) 及び／又はDNA(図17) を多数のデルフィニジン生産植物から単離し、³²P-ラベル化Hf1 cDNAによりプローブし、そして異なるストリンジンシー条件下で洗浄した。すべての例においてハイブリダイズするバンドを検出した。従って、他のビルフィニジン生産植物からの 3', 5' -ヒドロキシラーゼ遺伝子の単離は、プローブとしてペチュニアの 3', 5' -ヒドロキシラーゼ遺伝子を用いて可能である。

ここに記載した発明は、具体的に記載したもの以外の変更が可能であることを当業者は認識するであろう。本発明はこの様な変更のすべてを包含すると理解すべきである。本発明はまた、本明細書の

個々に又は集合的に言及され又は示される段階、特徴、組成物及び化合物、並びに該段階又は特徴の 2 以上の任意のそしてすべての組合せを包含する。

参考文献

- Asen, S., Stewart, R. N. 及び Norris, K. H. *Phytochemistry* 14:2677-2682, 1975.
 Asen, S., Griesbach, R. J., Norris, K. H. 及び Leonhardt, B. A. *Phytochemistry* 25:2509-2513, 1986.
 Ashikari, T., Kiuchi-Goto, N., Tanaka, Y., Shibano, Y., Amachi, T. 及び Yoshizumi, H. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30:515-520, 1989.
 Aviv, H. 及び Leder, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-1412, 1972.
 Beale, G. H. *Journal of Genetics* 40(3):337-358, 1940.
 Bethesda Research Laboratories. BRL pUC host: *E. coli* DH5α ™ competent cells. *Bethesda Res. Lab. Focus.* 8(2):9, 1986.
 Bozak, K. R., Yu, H., Sirevag, R. 及び Christoffersen, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3904-3908, 1990.
 Bullock, W. O., Fernandez, J. M. 及び Short, J. M. *Biotechniques* 5:378, 1987.
 Comai, L., Moran, P. 及び Maslyar, D. *Plant Molecular Biology* 15: 373-381, 1990.
 Cornu, A. *Genetics*. In: Petunia Sink, K. C. (Ed). Springer-Verlag, Berlin, Germany pp 35-47, 1984.
 Cornu, A., Farcy, E., Maizonnier, D., Haring, M., Veerman, W. 及び Gerats, A. G. M. In *Genetic maps-Locus maps of complex genomes*. 5th edition, Stephen J. O'Brien (Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1990.
 Dellaporta, S. J., Wood, J. 及び Hicks, J. B. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19

-21, 1983.

- De Vlaeminck, P., Gerats, A. G. M., Wiering, H. 及び Wijsman, H. J. W. *Plant Mol. Biol. Rep.* 2(2):21-42, 1984.
 Doodeman, M., Gerats, A. G. M., Schram, A. W., de Vlaeminck, P. 及び Bianchi, F. *Theor. Appl. Genet.* 67:357-366, 1984.
 Ebel, J. 及び Hahlbrock, K. In *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*. Harborne, J. B. (Ed.), Academic Press, New York, USA, 641-679, 1988.
 Forkmann, G. *Plant Breeding* 106:1-26, 1991.
 Forkmann, G. 及び Stotz, G. Z. *Naturforsch* 36c:411-416, 1981.
 Garfinkel, D. J. 及び Nester, E. W. J. *Bacteriol.* 144:732-743, 1980.
 Hagmann, M., Heller, W. 及び Grisebach, H. *Eur. J. Biochem.* 134:547-554, 1983.
 Hahlbrock, K. 及び Grisebach, H. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 30:105-130, 1979.
 Hanahan, D. J. *Mol. Biol.* 166:557, 1983.
 Harborne, J. B. 及び Simmonds, N. W. *Annu. Rep. John Innes Inst.* 53:29-30, 1962.
 Heller, W. 及び Forkmann, G. In: *The Flavonoids: Advances in Research Since 1980*. Harborne, J. B. (Ed.), Academic Press, New York, 1988.
 Holton, T. A. 及び Graham, M. W. *Nucleic Acids Research* 19:1156, 1991.
 Inoue, H., Nojima, H. 及び Okuyama, H. *Gene* 96:23-28, 1990.
 Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. 及び Kimura, A. J. *Bacteriol.* 153:163-168, 1983.
 Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. 及び Bevan, M. W. *EMBO J.* 6(13):3901-3907, 1987.
 Koes, R. E., Speilt, C. E., Reif, H. J., van den Elzen, P. J. M., Veltkamp,

- E. 及び Mol, J. N. M. *Nucl. Acids Res.* 14(13):5229-5239, 1986.
 Larson, R. L. 及び Bussard, J. B. *Plant Physiol.* 80:483-486, 1986.
 Lazo, G. R., Pascal, A. S. 及び Ludwig, R. A. *Bio/technology* 9:963-967, 1991.
 Lew, A. M. 及び Kemp, D. J. *Nucl. Acids Res.* 17(14):5859-5860, 1989.
 McBride, K. E. 及び Summerfelt, K. R. *Plant Molecular Biology* 14:269-276, 1990.
 Martin, P. M., Castro, N. M., Aboula-ela, F., Tinoco, I. *Nucl. Acids Res.* 13:8927-8938, 1985.
 Matthews, J. M., Dostal, L. A. 及び Bend, J. R. *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics* 235(1):186-190, 1985.
 Merrifield, J. *Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1964.
 Murashige, T. 及び Skoog, F. *Physiol. Plant* 15:73-97, 1962.
 Nebert, D. W., Nelson, D. R., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Feyereisen, R., Fujii-Kuriyama, Y., Gonzalez, P. J., Guengerich, F. P., Gunsalus, I. C., Johnson, E. F., Loper, J. C., Sato, R., Waterman, M. R., Waxman, D. J. *DNA and Cell Biology* 10:1-14, 1991.
 Norrander, J., Kemp, T. 及び Messing, J. *Gene* 26:101, 1983.
 Oeda, K., Sakaki, T., 及び Ohkawa, H. *DNA* 4:203-210, 1985.
 O'Keefe, D. P. 及び Leto, K. J. *Plant Physiol.* 89:1141-1149, 1989.
 Ohtsuka, E., Matsuki, S., Ikehara, M., Takahashi, Y. 及び Matsubara, K. *J. Biol. Chem.* 260(5):2605-2608, 1985.
 Pearson, W. R. 及び Lipman, D. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448, 1988.
 Rademacher, W., Pritsch, H., Graebe, J. E., Sauter, H. 及び Jung, J. *Pesticide Science* 21:241-252, 1987.
 Sambrook, J., Pritsch, E. F. 及び Maniatis, T. *Molecular Cloning: A*

Laboratory Manual(2nd edition).Cold Spring Harbor Laboratory Press.USA.1989.
 Sanger.P., Nicklen.S. 及び Coulson.A. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74: 5463-5467.1977.
 Schenk.R.U. 及び Hilderbrandt.A.C. Can.J.Bot.50:199-204.1972.
 Schram.A.W., Jonsson.L.M.V. 及び Bennink.G.J.H. Biochemistry of flavonoid synthesis in Petunia hybrida. In: Petunia Sink.K.C. (ed.) Springer-Verlag. Berlin. Germany pp 68-75. 1984.
 Stafford.H.A. Flavonoid Metabolism. CRC Press. Inc. Boca Raton. Florida. USA. 1990.
 Stotz.G. 及び Forkmann.G. Z. Naturforsch 37c:19-23.1982.
 Stotz.G., de Vlaming.P., Wiering.H. 及び Forkmann.G. Theor. Appl. Genet. 70:300.1985.
 Takeda.K., Kubota.R. 及び Yagioka.C. Phytochemistry 24:1207.1985.
 Takemori.S. 及び Kominami.S. Cytochrome P450. Tokyo University Press. Japan. 1989.
 Taton.M., Ullman.P., Beneveniste.P. 及び Rahier.A. Pesticide Biochemistry and Physiology 30:178-189.1988.
 Turpen.T.H. 及び Griffith.O.M. Bio Techniques 4:11-15.1986.
 van Tunen.A.J., Gerats.A.G.M. 及び Mol.J.N.W. Plant Mol.Biol.Rep. 8:50-59.1990.
 van Tunen.A.J., Koes.R.E., Speit.C.E. van der Krogt.A.R., Stuitje.A.R. 及び Mol.J.N.W. EMBO J. 7(5):1257-1263.1988.
 van Tunen.A.J., Mur.L.A., Recourt.K., Gerats.A.G.M. 及び Mol.J.N.W. The Plant Cell 3:39-48.1991.
 von Wettstein-Knowles.P. Hereditas 60:317-346.1968.
 Vercruyse.S.A.R., Delcour.J.A. 及び Dondyne.P.J. Chromatography

324:495-497.1985.
 Wallroth.M., Gerats.A.G.M., Rogers.S.G., Praley.R.T. 及び Horsch.R.B. Mol.Gen.Genet. 202:6-15.1986.
 Wiering.H. and De Vlaming.P. Inheritance and Biochemistry of Pigments. In: Petunia Sink.K.C. (Ed.), Springer-Verlag. Berlin. Germany pp 49-65.1984.
 Wiering.H. Genen Phaenen 17(1-2):117-134.1974.
 Yanisch-Perron.C., Vieira.J. 及び Messing.J. Gene 33:103.1985.

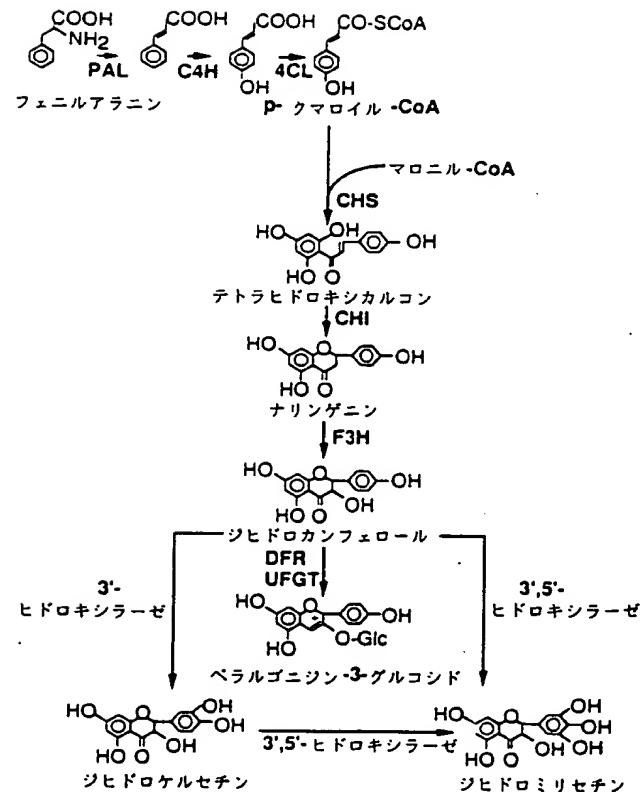
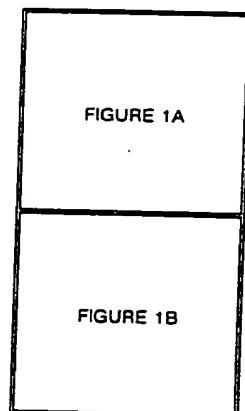


FIGURE 1A

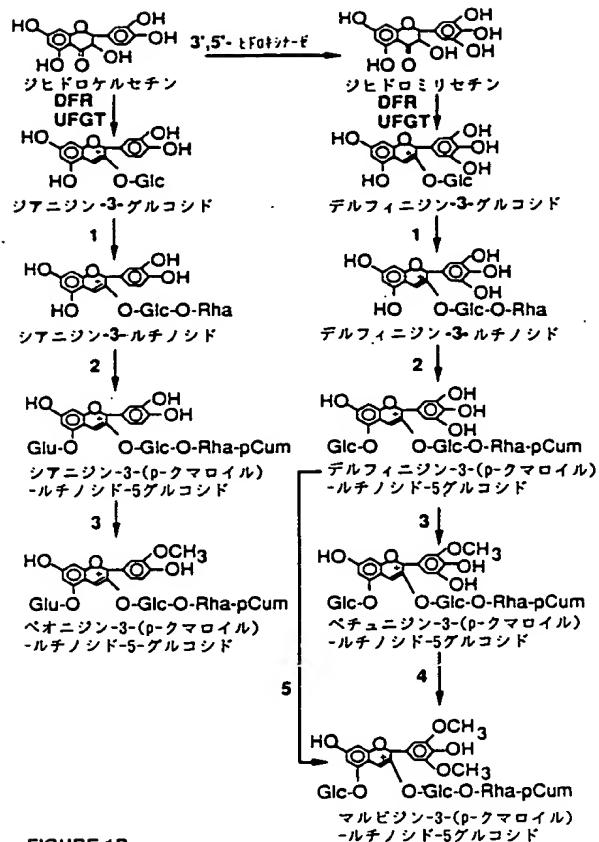


FIGURE 1B

FIG 2

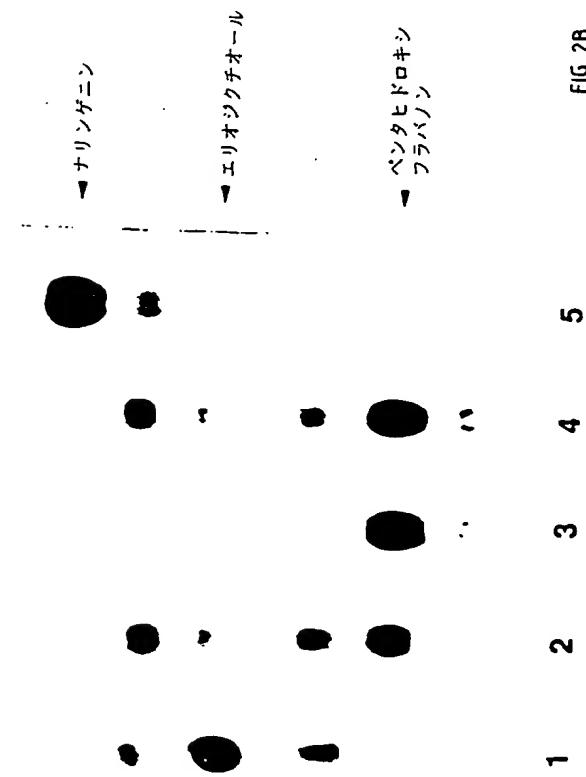
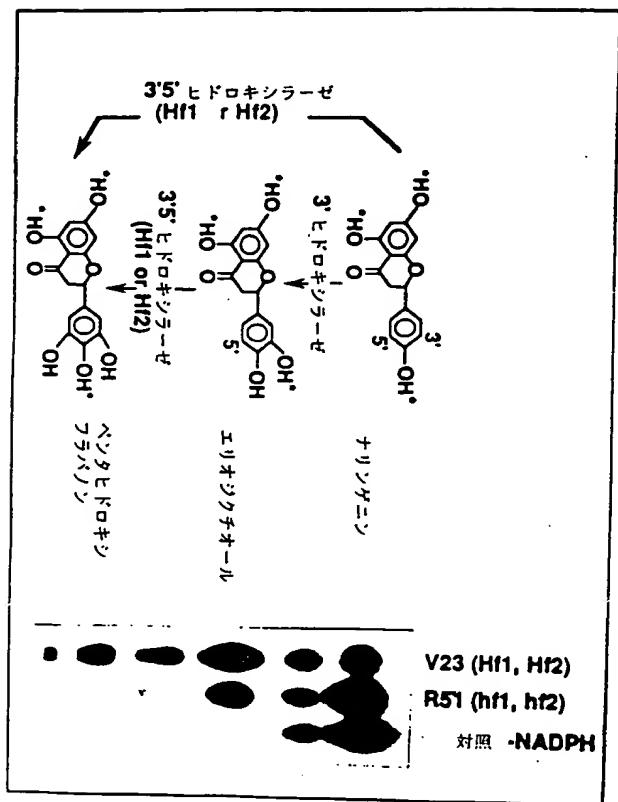


FIG 2B

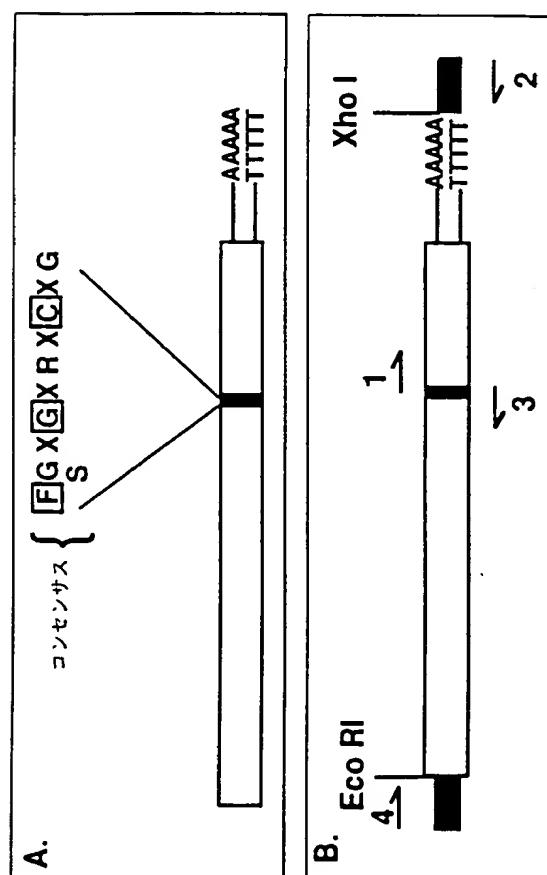


FIGURE 3

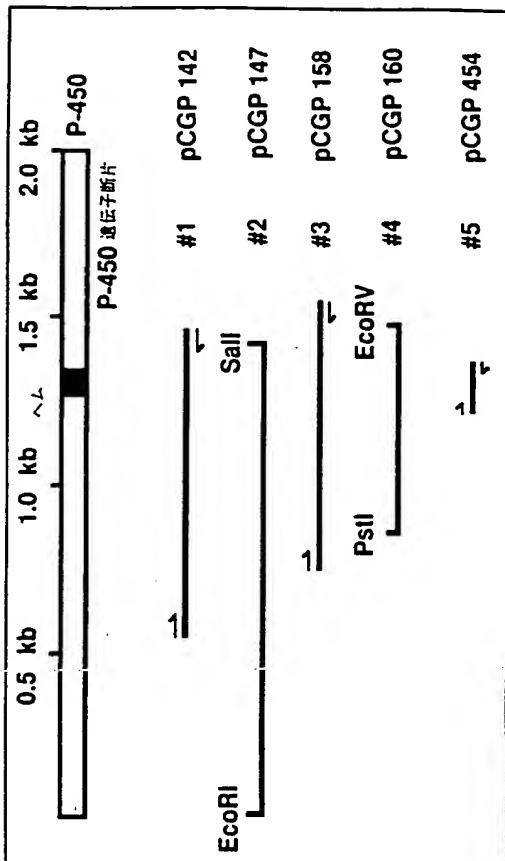


FIGURE 4A

F S S I R N D E I S S L
 TTT AGT TCA ATT CGG AAT GAT GAG ATT TCG AGT CTC
 I S S I H S M N G S V V
 ATT TCA TCA ATT CAT TCC ATG AAC GGT TCT GTT GTC
 N M T Q K I L C F T N S
 AAC ATG ACA CAA AAG ATT CTT TGT TTT ACA AAC TCT
 V T C R T A F G K V Y K
 GTG ACT TGT AGA ACA GCT TTC GGG AAA GTA TAC AAC
 N Q N E L I N L M R E V
 AAT CAA AAT GAA TTG ATA AAC TTG ATG AGG GAA GTA
 L E L V G G F D -----
 CTG GAA TTA GTA GGA GGA TTT GAT -----
 F E N S P V E F I G N H
 TTT GAA AAT TCT CCG GTT GAG TTT ATT GGA AAT CAC
 F E L V P F G A G K R I
 TTT GAG CTT GTT CCG TTT GGT GCA GGA AAA AGG ATT
 C P G M Q F G L A N I R
 TGT CCA GGA ATG CAA TTT GGT TTA GCT AAT ATT AGA
 H P L A R F L Y H F N W
 CAT CCT TTG GCT CGA TTC CTC TAC CAT TTT AAC TGG
 A L P Y E T N P E D L D
 GCG CTT CCA TAT GAA ACT AAT CCT GAA GAT TTA GAT
 S L K N M D
 AGT CTG AAA AAT ATG GAT TAA GTGCAGCAAAAGAGAAAAGA
 TCTATACTTAATTGCCGTAGATCACAAAAGAAGGTGATATAAAATT
 TGATGTTCTGCTTAAATGGTAAAGTCAACTCTACACAATGCTTC
 ATCTCCTTAATTGAGTTGGTGTACATTGTGTCTCCCTTTAGCT
 TTGAATTTCACCTTGAAAATGTCACATTTCCTTTCTGTTACTC
 CAATTAAGATATGTTGTGGTGTCAATTATGCCATATTTCAA
 AAGATCAAATCAATTCCCTGGTGTAAAGTATAGATTATAAAACTGA
 TTAATGAATCAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURE 4B

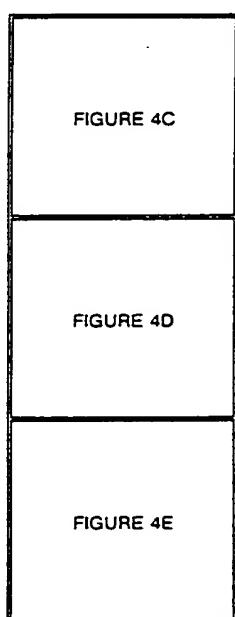


FIGURE 4C

FIGURE 4D

FIGURE 4E

Q F F N L V S F L L I V F S L
 TGCAATTTCACTTGGTTCTCTCTTCTATTGTATTTCCTC
 10 20 30 40
 I S L R K W K K S N C Q T K K L
 ATTCATTAAGAAAATGGAAGAAATCCAATTGTCAAACCAAAATTG
 58 68 78 88
 P P G P W K V P F L G S L L H M
 CCTCCAGGCCATGGAAAGTACCTTTCTGGAGCTGCTCATATG
 106 116 126 136
 V G G L P H H V L R D L A K K Y
 TAGGTGGACTTCCACACCATGCTTAGAGATTAGCCAAAAATAT
 154 164 174 184
 G P I M H L O L G K I S A V V V
 GGACCAATTATGCACTTCACACTAGGTAAAATTCTGCCGTGTAGT
 202 212 222 232
 T S P E M A R K V L K T H D L A
 ACTTCCTCTGAGATGGCAAGAAAAGTACTAAAACATGACCTTGCA
 250 260 270 280
 F A Y R P K L L G I E I V C Y N
 TTGCACTATGCCCTAAACTCTAGGCATTGGAGATTGCTGTGATAAT
 298 308 318 328
 S S D I A F S P Y G D Y W R Q M
 AGTCAGACATGCCCTTCCCCTATGGTGATTACTGGAGGCAAATG
 346 356 366 376
 R K I C V L E V L S A K N V R S
 CGTAAATTTGTGTATTGGAAAGTGCCTAGTGCCTAAATGTCGGTCA
 394 404 414 424
 F N S I R R D E I L L M I D F L
 TTAACCTCGATAGACGAGATGAAATACTCTTATGATCGATTTTG
 442 452 462 472
 R S S S G K P V N I T E R I F S
 CGATCATCTCTGGTAAGCCAGTTAATACAAGAAAGGATTTCA
 490 500 510 520

FIGURE 4C

F T S S M I C R S V F G K R I K
TTCAAGCTCATGATTGTAGATCAGTATTGGAAAAGAATAAG
538 548 558 568

E K D E C I R H V K K M T G L I
GAGAAAGACGAATGATACGACATGTGAAAAAAATGACAGGCTTAATA
586 596 606 616

D G F D V A D I F P S L R F L H
GATGGGTTGATGTCGACATTCCTCGTGGAGGTTCTCAT
634 644 654 664

V L I G M K G K I M D V H R K V
GTACTAATCGGTATGAAGGGTAAATTATGGATGTCATCGTAAGGTA
682 692 702 712

D A I V E E V M N E H K E T L R
GATGCTATTGAGGAACTGATGAGCACAAAGAAACTCTCGA
730 740 750 760

T G K T N G E V G G E D L I D V
ACTGGCAAGAACATGGTGAAGTGGGAGGAGAAGATTAATTGATGTA
778 788 798 808

L L R L K E E G D L Q L P I T N
TTGCTAAGACTTAAGGAAGGGAGACCTCAACTCCAACTCACAAAT
826 836 846 856

D N I K A I F N D M F A A G T E
GACAACATCAAAGCCATTAACTGAGCATGTTGCTGGGAAACAGAA
874 884 894 904

T S S T T I N W A M V E L M K N
ACTTCATCAACAACATTAACTGGGCATGGTAGAAGTGTGAAAT
922 932 942 952

P S V F A K A O A E V R E V F K
CCAAGTGATTGCGAAAGCTCAGAGGTAAGAGAAGTCTCAAA
970 980 990 1000

G K E T F D E D D I E E L N Y L
GGGAAAGAAACTTCGATGAAGATGATATCGAGGAGCTGAATTACCTT
1018 1028 1038 1048

K L V I R E T L R L H P P L P L
AAGTTAGTCATTAGAGAACTTAAAGACTCCACCTCCACTTCACTT
1066 1076 1086 1096

FIGURE 4D

L L P R E C R R E T E I N G Y T
TTGCTTCAAGAGAAATGTCGGAGAGAAACAGAAATAATGGCTACACT
1114 1124 1134 1144

I P L N T K V I V N V W A I G R
ATTCTCTTAAATACCAAAGTCATAGTTAATGTTGGCTATTGGAGA
1162 1172 1182 1192

D P K Y W D D A E S F K P E R F
GATCCAAATATTGGGATGTCGAGAAAGCTTAAAGCTGAGAGATT
1210 1220 1230 1240

E R N S L N F A G N N F E Y L P
GAACATAACTCTTGAATTGCTGGCAATAATTGAAATATCTCCT
1258 1268 1278 1288

F G S G R R I C P G I S F G L A
TTGGTAGGAAAGGAGGATTGCCCGGAATATCATTGGTTAGCT
1306 1316 1326 1336

N V Y H P L A Q L L Y H F D W R
AATGTTTATCATCCATTGCTCAATTGTTGATCATTGATTGGAGA
1354 1364 1374 1384

L P T G V D P N D F E L T S *
CTTCTACTGGGTCGACCCAAATGACTTTGAATTGACTAGTTAGCTG
1402 1412 1422 1432

GAGTAACTACTGGTAGGAAAGAGACCTTACTTGATTTCACCTCTT
1450 1460 1470 1480

ATTACCTCTCTAAAGTGATTAATGG-GCAAATTAAATTGAAAT
1498 1508 1518 1528

AATACTTTCTGTTACATTCTCTCCATTGTTGATTTCACTTA
1546 1556 1566 1576

CCTATTGTTGACTCTTCTTGTGATGCTTAGGTTTACCTAT
1594 1604 1614 1624

TTCTATGCATTTGATTTAAAAAAAAAAAAAAA
1642 1652 1662

FIGURE 4E

pCGP158
Gly Met Met Lys Glu Gly Asp Phe Leu Asp Val Leu
GGG ATG ATG AAG CAA GGA GAT TTC TTG GAT GTA CTT
Ley Asp Glu Cys Asp Glu Glu Gly Ser Gly Phe Asp
CTT GAT CAA TGT GAT GAA GAA GGG TCT GGA TTT GAT
Arg Glu Thr Ile Lys Pro Ley Ile Ley Asp Ley Phe
CGC CAA ACT ATC AAG CCT CTC ATC CTG GAT TTA TTC
Ile Ala Gly Ser Asp Thr Ser Ala Ile Thr Thr Glu
ATT GCT GGA AGT GAT ACA TCT GCC ATA ACA ACA GAA
Trp Ala Met Ala Glu Ley Ley Arg Lys Pro Glu Glu
TGG GCA ATG GCA GAA CTA CTT CGA AAA CCT CAA GAA

Phe Val Asn Ala Trp Ala Ile Gly Arg Asp Pro Lys
TTT GTG AAT GCA TGG GCA ATT GGA AGA GAT CCA AAA
Tyr Trp Glu Lys Pro Ley Glu Phe Met Pro Glu Arg
TAC TGG GAA AAA CCA CTG GAG TTT ATG CCT GAA AGA
Phe Ley Lys Cys Ser Ley Asp Tyr Lys Gly Arg ---
TTC TTG AAG TGT AGT TTG GAT TAC AAA GGT AGG G--
Phe Ley Tyr Ile Pro Phe Gly Ala Gly Arg Arg Ile
TTT GAG TAT ATA CCA TTT GGC GCA GGT CGA AGA ATT
Cys Pro Gly Met Pro His Cys Asn Lys Asp Gly Glu
TGT CCT GGA ATG CCA CAT TGC AAT AAG GAT GGT GAA
Phe Asp Ala Gly Phe Asp Tyr Ser Pro Phe Ser Trp
TTT GAT GCT GGC TTC GAT TAT TCA CCA TTT AGT TGG
Glu Ley Pro --- Gly Met Ala Pro Lys --- Ley Asn
GAA TTA CCT -AA GGA ATG GCA CCA AAG -AT TTG AAC
Met Glu Glu Gln Phe Gly Val Thr Ley Arg Lys Ala
ATG GAG GAA CAG TTT GGA GTT ACC TTG AGG AAG GCT
Ile Pro Ley Ile Ala Ile Pro Ser Met Glu Glu Lys
ATT CCC CTT ATT GCC ATT CCC AGT ATG GAA GAA AAG
Val Ile Phe
GTC ATA TTT TAG CCCAAAAGCTATGCATTTGTGTATGTT

FIGURE 4F

pCGP 160

K Q I N A L L V E I F G
AAA CAG ATC AAT GCA TTG CTT GTG GAA ATA TTT GGA
A G T E S T T A T S Q W
GCT GGT ACA GAA TCT ACA ACT GCT ACA AGC CAA TGG
M L V E L L R N R Q A L
ATG CTT GTA GAA CTC CTT AGA AAT CGA CAA GCC TTG
----- P K D T Q V M V N
----- CCC AAA GAC ACT CAA GTT ATG GTA AAC
E W A I A Y D P K I W G
GAG TGG GCG ATT GCG TAT GAT CCT AGT ATT TGG GGC
S F K P Q R F I D S K I
AGC TTC AAA CCC GAA AGG TTT ATC GAT TCA AAA ATA
D P L D H K G Q N F E Y
GAT CCT TTG GAC CAC AAA GGG CAA AAT TTT GAA TAT
F P F G S G R R I C A G
TTT CCT TTT GGT TCT GGA AGG AGA ATT TGT GCT GGA
E P L A S R V I P L A V
GAA CCT TTG GCT TCT AGG GTT ATT CCC TTA GCT GTT
A S M I H K F -----
GCT TCT ATG ATC CAT AAG TTT ----- GATATCACTAT
GTTAGAAGATCCACTCTCATCATTCTAAGTTGAGAAGAGTGGAGAA
ATTAAGAAGCAGAAAGATACTTACTATAAAACTCGTTATATATA
TATATATTGCTGTATCTATATGTTGATGATCTGCTGCTCATGT
TGTGTTTGTGTTGTTGACTATAGGTCACTACCTAAGTTGATGAAA
TGTCTCTGAGAATATACCTCTTATAATAGGAGTAATTACCGA
TAATTAATATTCTGCGACAAAAAAA

FIGURE 4G

- R E S M E D V R L L G
 CT CGA GAA TCA ATG GAA GAT GTA AGA TTA CTA CGC
 Y H I P A K T R L F I N
 TAT CAC ATA CCT GCT AAA ACG AGA CTC TTT ATC AAT
 A W T M G R D P L T W E
 GCT TGG ACA ATG GGG AGA GAC CCA CTA ACA TGG GAA
 N P E E Y Q P E R F L N
 AAT CCA GAA GAG TAT CAG CCA GAG AGA TTC TTG AAT
 R D T D V K G V N F E F
 AGA GAT ACT GAT GTC AAA GGA GTA AAC TTT GAG TTC
 I P F G A G R S
 ATT CCC TTT GGC GCC GGC AGA AGC

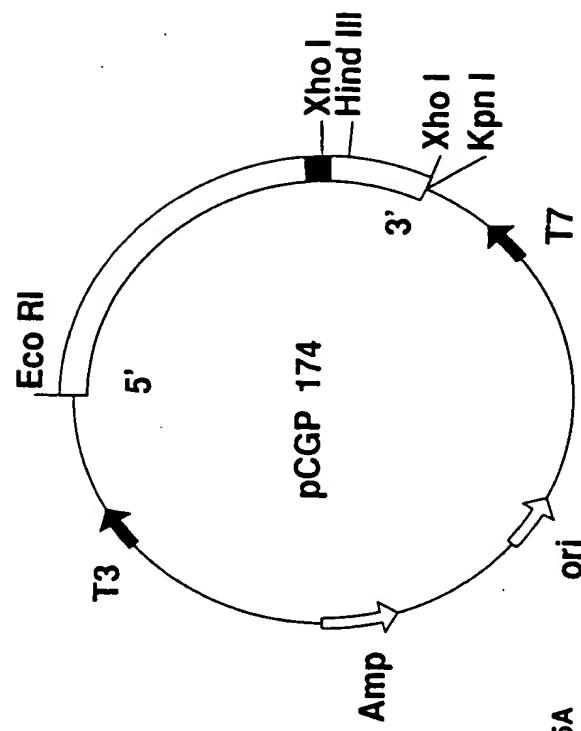


FIGURE 4H

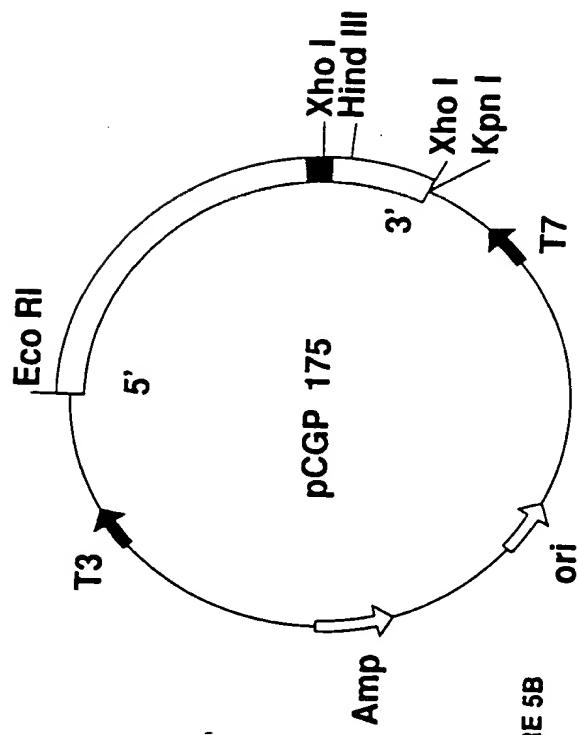


FIGURE 5B

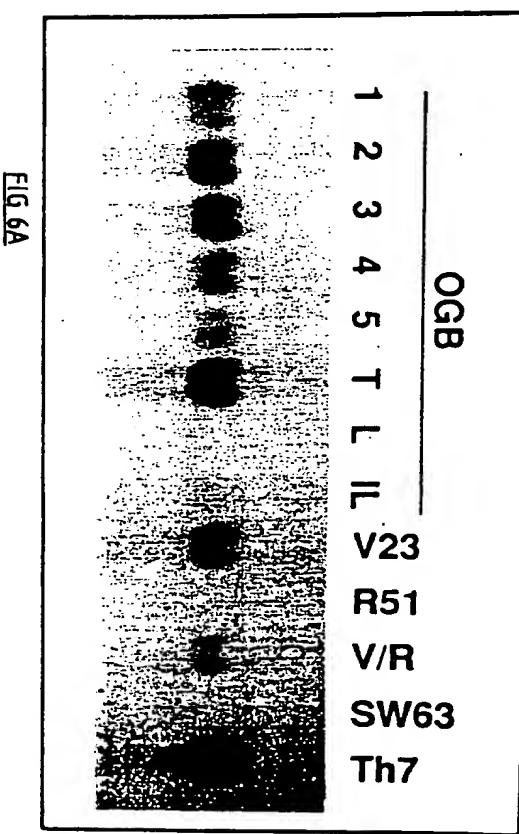


FIGURE 5A

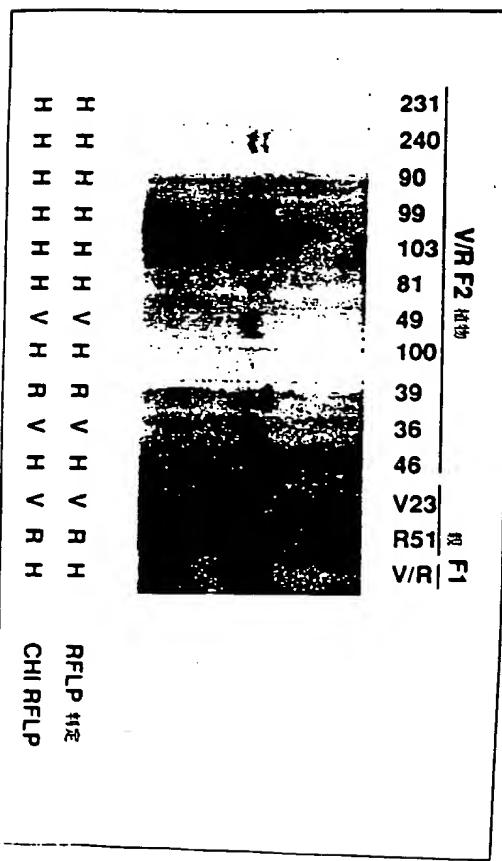
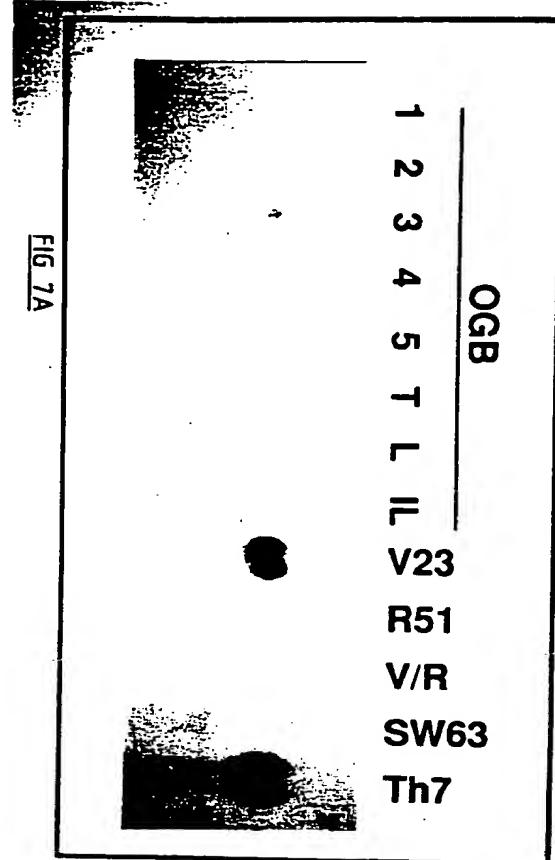
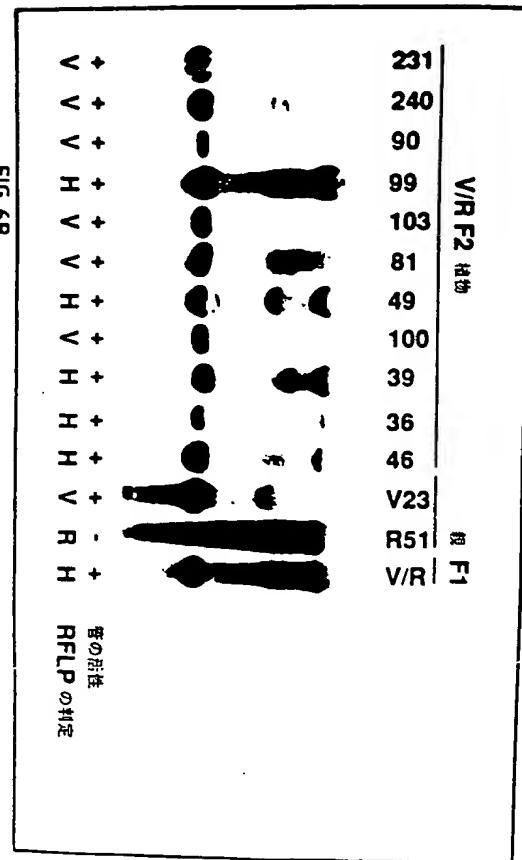
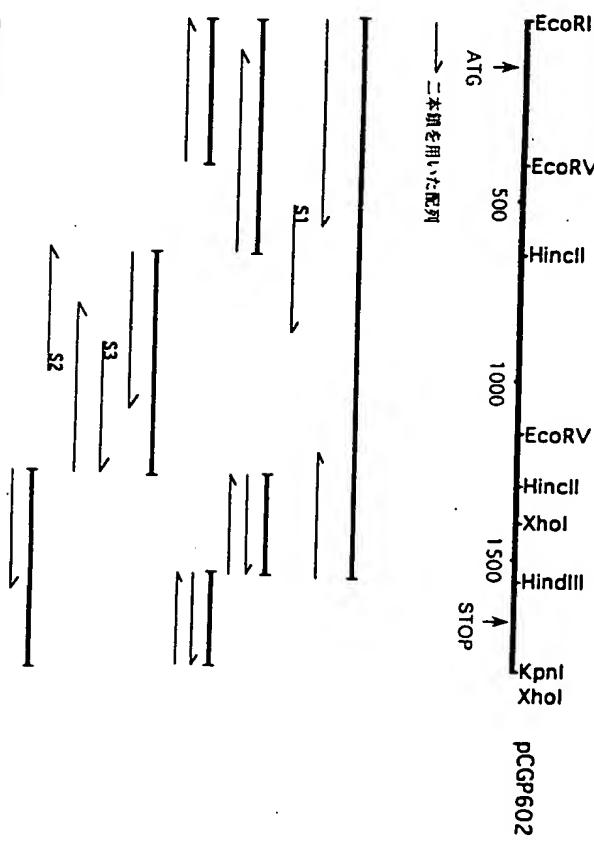


FIGURE 8



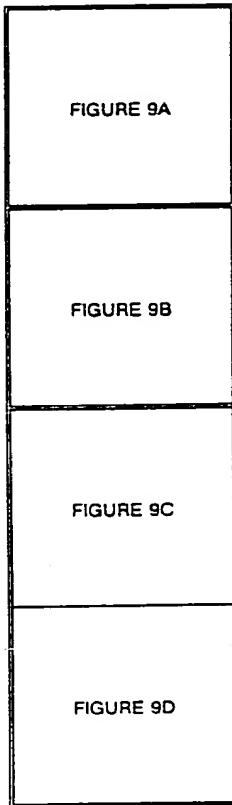


FIGURE 9A

FIGURE 9B

FIGURE 9C

FIGURE 9D

CTTTCTACTAGCTACTTCGTTATATATATGTAAATTGTGACTT
 10 20 30 40
 GAAAATCATTTAAATTATCATAAGGTTCACTTTATCTTGATCAA
 55 65 75 85
 M M L
 ATATTTACTCGGCCATATACGTTCCCTTAGTCATGATGCTAC
 100 110 120 130
 L T E L G A A T S I F L I A H
 TTACTGAGCTTGGTGCAGCAACTCAATCTTCTAATAGCACACA
 145 155 165 175
 I I I S T L I S K T T G R H L
 TAATCATTCACTCTTATTCAAAAACCTACGGCGGCACTCTAC
 190 200 210 220
 P P G P R G W P V I G A L P L
 CGCCGGGGCCAAGAGGGTGGCCGGTATCGGAGCACTTCACCTT
 235 245 255 265
 L G A M P H V S L A K M A K K
 TAGGAGCCATGCCACATGTTCTCTAGCTAAATGGCAAAAAAAAT
 280 290 300 310
 Y G A I M Y L K V G T C G M A
 ATGGAGCACTCATGTTCTCAAAGTTGAAACATGTGGCATGGCAG
 325 335 345 355
 V A S T P D A A K A F L K T L
 TTGCTTCTCCCTGATGCTGCTAAAGCATTCTGAAACACTTGC
 370 380 390 400
 D I N F S N R P P N A G A T H
 ATATCAACTCTCCAACTGTCACCTAAATGCAGGTGCCACTCACT
 415 425 435 445
 L A Y N A Q D M V F A H Y G P
 TAGCTTAAATGCTCAAGACATGGTTTGACATTATGGACCAC
 460 470 480 490
 R W K L L R K L S N L H M L G
 GATGGAAGTTGCTAAGGAAATTAAGCAACTTGCAATATGCTAGGG
 505 515 525 535

FIGURE 9A

G K A L E N W A N V R A N E L
 GAAAAGCCTTAGAGAAATTGGCAATGTCGCAATGAGCTAG
 550 560 570 580
 G H M L K S M S D M S R E G Q
 GGACATGCTAAATCAATGTCGATATGAGTCGAGAGGGCCAGA
 595 605 615 625
 R V V V A E M L T F A M A N M
 GGGTTGTTGGCGGAGATGTTGACATTGCCATGGCAATATGA
 640 650 660 670
 I G Q V M L S K R V F V D K G
 TCGGACAAGTGTGCTAACAAAAGGTATTGAGATAAAAGTG
 685 695 705 715
 V E V N E F K D M V V E L M T
 TTGAGGTAAATGAATTAGGACATGGTTGAGAGTTAATGACAA
 730 740 750 760
 I A G Y F N I G D F I P C L A
 TAGCAGGGTATTCAACATTGGTGTATTCTCTTTAGCTT
 775 785 795 805
 W M D L Q G I E K R M K R L H
 GGATGGATTACAAGGGATAGAAAACGAATGAAACCTTACATA
 820 830 840 850
 K K F D A L L T K M F D E H K
 AGAAGTTGATGCTTATGACAAAGATGTTGATGAAACACAAAG
 865 875 885 895
 A T T Y E R K G K P D F L D V
 CAACTACCTATGACAGTAACGGGAAACAGATTTCTGATGTTG
 910 920 930 940
 V M E N G D N S E G E R L S T
 TTATGGAAAATGGGACAATTCTGAAGGAGAAAGACTCAGTACAA
 955 965 975 985
 T N I K A L L L N L F T A G T
 CCAACATCAAAGCACTTTGCTGAATTGTTCACAGCTGGTACGG
 1000 1010 1020 1030

D T S S S A I E W A L A E M M
 ACACCTCTCTAGGCAATAGAATGGGACTTCGAGAAATGATGA
 1045 1055 1065 1075
 K N P A I L K K A Q A E M D Q
 AGAACCCCTGCCATTGAAAAGCACAAGCAGAAATGGATCAAG
 1090 1100 1110 1120
 V I G R N R R L L E S D I P N
 TCATTGGAAAGAAATAGGCTTACTCGAATCCGATATCCAAATC
 1135 1145 1155 1165
 L P Y L R A I C K E T F R K H
 TCCCCTTACCTCCGAGCAATTGCAAAGAACATTGCAACACC
 1180 1190 1200 1210
 P S T P L N L P R I S N E P C
 CCTCTACACCAATTAACTCTCTAGGATCTCGAACGAACCATGCA
 1225 1235 1245 1255
 I V D G Y Y I P K N T R L S V
 TAGTCGATGGTTATTACATACCAAAAAACACTAGGCTTACTGTTA
 1270 1280 1290 1300
 N I W A I G R D P Q V W E N P
 ACATATGGCAATTGGAAGAGATCCCCAAGTTGGAAAATCCAC
 1315 1325 1335 1345
 L E F N P E R F L S G R N S K
 TAGAGTTAAATCCGAAAGATTCTGAGTGGAAAGAAACTCCAGA
 1360 1370 1380 1390
 I D P R G N D F E L I P F G A
 TTGATCTCGAGGGAAACGATTTGATGATACCATTTGGTCTG
 1405 1415 1425 1435
 G R R I C A G T R M G I V M V
 GACGAAGAAATTGTCAGGAAACAGAATGGAAATTGTAATGGTGG
 1450 1460 1470 1480
 E Y I L G T L V H S F D W K L
 AATATATATTAGGAACCTTGGTCATTCAATTGATGGAAATTAC
 1495 1505 1515 1525

FIGURE 9C

FIGURE 9B

P S E V I E L N M E E A F G L
 CAAATGAAAGTTATTGAGTGAATGGAAAGGCTTTGGCTTAG
 1540 1550 1560 1570

A L Q K A V P L E A M V T P R
 CTTGCAGAAAGCTGCCCCCTTGAAAGCTATGGTACTCCAAGGT
 1585 1595 1605 1615

L Q L D V Y V P *
 TACAATTGGATGTTATGTACCATAGCTATAGATGTCTATTGTGC
 1630 1640 1650 1660

TATAATTGCCATGTTGGTTGAGCATGAGATATAAAAGGA
 1675 1685 1695 1705

GTACATGAAGCGCATTGCATGAGTTAACCTGTAGCTCCCTAATA
 1720 1730 1740 1750

TTTAGGTATTTCAATTAAAGTTCTTGTGGTGGTAAAA
 1765 1775 1785 1795

AAAAAAAAAAAA
 1810

FIGURE 10A

FIGURE 10B

FIGURE 10C

FIGURE 9D

M V L L S E
 TTGAATCCACCTCTATCTGGCTTTAGACAATGGTCTACTTAGTG
 10 20 30 40

L A A A T L I F L T T H I F I
 AGCTTGCTGCAGCAACCTTAATCTTCTAACACACATATCTCA
 55 65 75 85

S T L L S I T N G R R L P P G
 TTTCAACTCTCTTCTATAACTAACGGCCGGCTCTCCGCCAG
 100 110 120 130

P R G W P V I G A L P L L G A
 GGCCAAAGGGGGGGGGTGGTGGAGGACTTCCACTTTAGGAG
 145 155 165 175

M P H V S L A K M A K K Y G A
 CCATGCCACATGTTCTTGTCAAATGGCAAAAAATATGGAG
 190 200 210 220

I M Y L K V G T C G M V V A S
 CAATCATGTATCTCAAAGTGGAACGTGGCATGGTAGTGGCTT
 235 245 255 265

T P D A A K A F L K T L D L N
 CTACCCCCATGATGCTGCTAACGGCTCTGAAAACACTTGCTCA
 280 290 300 310

F S N R P P N A G A T H L A Y
 ACTCTCTCAATCGTCCACCTAAATGCAAGGTGGCACCCACTTGGCT
 325 335 345 355

G A Q D M V F A H Y G P R W K
 ATGGTGCTCAAGACATGGTTTGTGACATTGACCAAGATGGAG
 370 380 390 400

L L R K L S N L H M L G G K A
 AGTTGCTAAGGAAATTAAAGCAACTTACATATGCTAGGGGGAAAG
 415 425 435 445

L E N W A N V R A N E L G H M
 CCTTAGAAAATTGGCAATGTCGTGCAATGAGCTAGGACACA
 460 470 480 490

L K S M F D M S R E G E R V V
 TGCTAAATCGATTTGATGAGCAGAGAAGGGGAGAGATG
 505 515 525 535

V A E M L T F A M A N N M I G Q
 TTGGCCGGAGATGGACATTGGCATGGCAATAATGATGGAC
 550 560 570 580

V I L S K R V F V N K G V E V
 AGGTGATACTTAGCAAAAGAGTATTGTAATAAAGGTGTTGAGG
 595 605 615 625

N E F K D M V V E L M T T A G
 TAAATGAATTAAGGACATGGTGTAGAGTTAATGACAACAGCAG
 640 650 660 670

Y F N I G D F I P C L A W M D
 GGTATTTAACATGGTATTCTCTGTGTTAGCTGGATGG
 685 695 705 715

L O G I E K G M K R L H K K F
 ATTACAAGGGATAGAAAAGGAATGAAACGTTACATAAGAGT
 730 740 750 760

D A L L T K M F D E H K A T S
 TTGATGCTTATTGACAAAAGATGTTGATGAACACAAGCAACTA
 775 785 795 805

Y E R K G K P D F L D C V M E
 GCTATGAACTGAAGGGAAACCAGATTCTGTGTTAGCTGGTATGG
 820 830 840 850

N R D N S E G E R L S T T N I
 AAAATAGGACAACTCTGAAGGGAAAGGCTCAGTACAACCAACA
 865 875 885 895

K A L L L N L F T A G T D T S
 TCAAAGCACTCTGCTGAATTGTCACAGCTGGTACAGACACTT
 910 920 930 940

S S A I E W A L A E M M K N P
 CTTCTAGTGCAATAGAATGGGCACITGCAAGAGATGATGAAGAAC
 955 965 975 985

A I L K K A Q G E M D Q V I G
 CTGGCATTAAAGAAAGCACAAAGGAAATGGATCAAGTCATTG
 1000 1010 1020 1030

N N R R L L E S D I P N L P Y
 GAAACAATAGGCCTGCTGCAATGGATATCCAAATCTCCCTT
 1045 1055 1065 1075

FIGURE 10A

FIGURE 10B

L R A I C K E T F R K H P S T
ACCTCCGAGCAATTGCAAAGAAACATTCGAAAGCACCCCTTA
1090 1100 1120

P L N L P R I S N E P C I V D
CACCATTTAATCTCCCTAGGATCTCGAACCGAACCATGCATTGCG
1135 1145 1155 1165

G Y Y I P K N T R L S V N I W
ATGGTTTACATACCAAAAAACACTAGGCTTAGTGTAAACATAT
1180 1190 1200 1210

A I G R D P E V W E N P L E F
GGCAATTGGAAGAGATCCCAGTTGGAGAACCCACTAGAGT
1225 1235 1245 1255

Y P E R F L S G R N S K I D P
TTTATCCTGAAGGTTCTTGAGTGGAAAGAAACTCGAACAGATTGATC
1270 1280 1300

R G N D F E L I P F G A G R R
CTCGAGGGAAACGACTTGAATTGATAACCATTTGGCTGGACCAA
1315 1325 1335 1345

I C A G T R M G I V M V E Y I
GAATTGGCAGGGACAAGAATGGGAATCGTAATGGAAATATA
1360 1370 1380 1390

L G T L V H S F D W K L P S E
TATAGGAATTGGTCATTGATTGGAAATTACCAAGTG
1405 1415 1425 1435

V I E L N M E E A F G L A L Q
AAGTTATTGAGCTAAATATGGAAGAACGCTTGGATTAGCTTGC
1450 1460 1470 1480

K A V P L E A M V T P R L P I
AGAAAGCTGCTCTCTTGAAAGCTATGGTTACTCCAAGGCTGCCTA
1495 1505 1515 1525

D V Y A P L A *
TTCACTTTATGCCACCTTIACTGAAACATGCCCTTACGTTGGT
1540 1550 1560 1570

TTCAGTTTGGTAGTATAATGTTGTTGGCTATAGAAAAT
ATTAATAATGCTAGTATCTGAAGGGCGTGCAGGGGGAGGGGG
TTGTCTTAGATAGTAGTAATATGTTAGCCTCTTTATTTCTTG
TGATTGTGAGAATCTTGATATGTTCTTGAAAAAAAAAAAAAA

FIGURE 10C

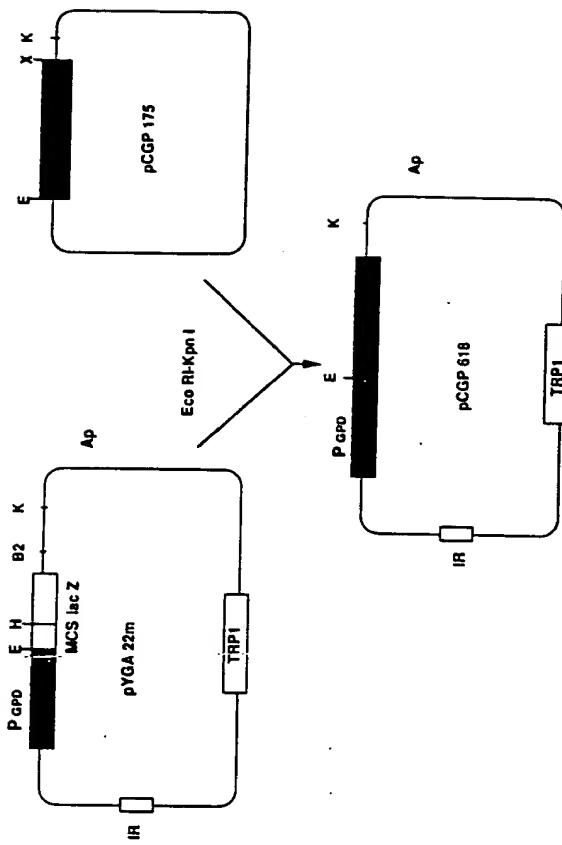


FIGURE 11

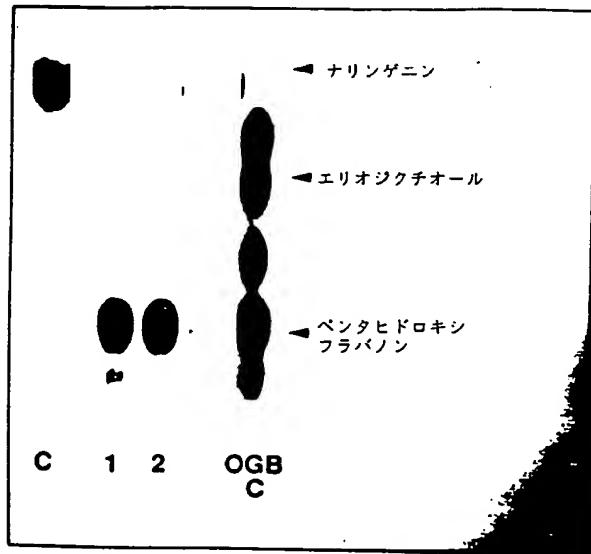


FIG 12A

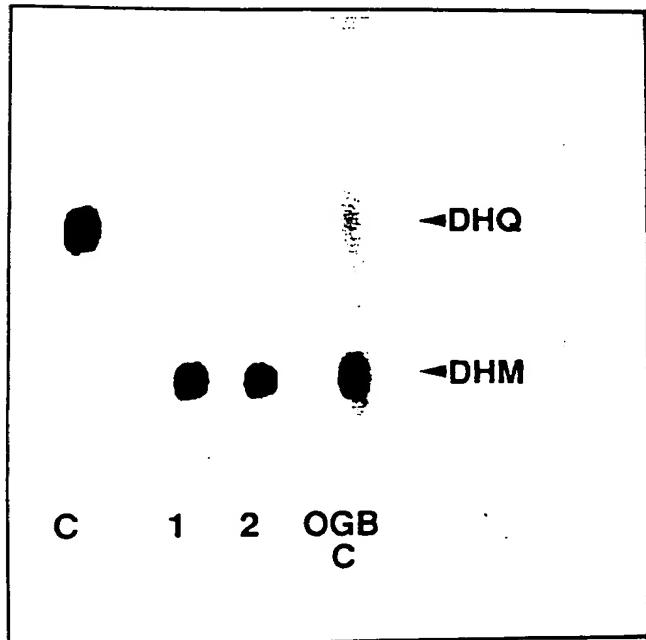


FIG 12B

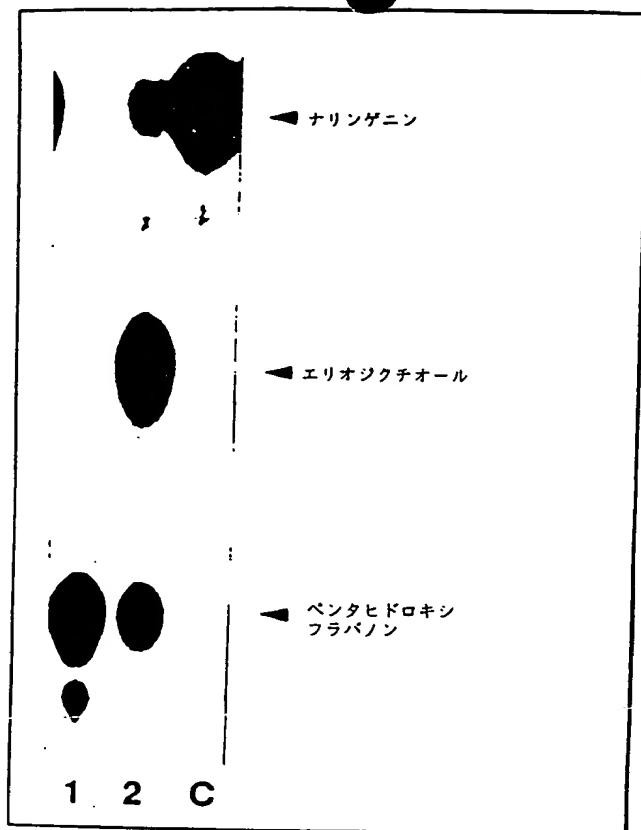


FIG. 13

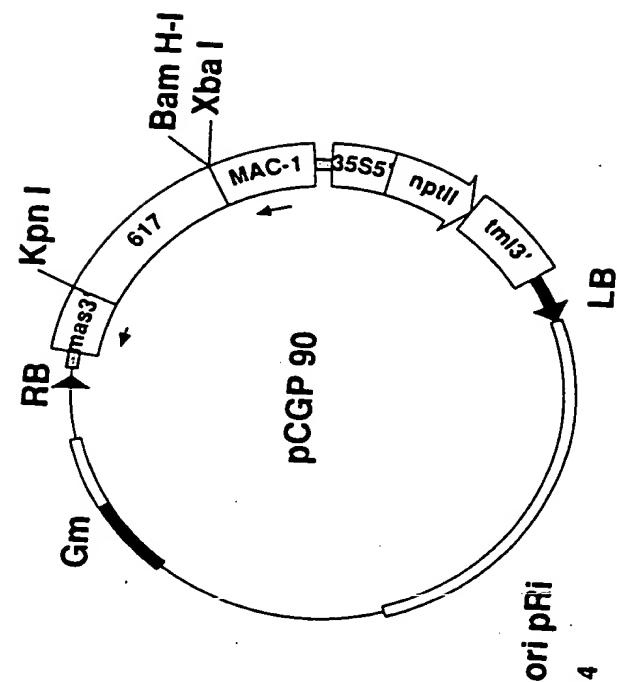


FIGURE 14

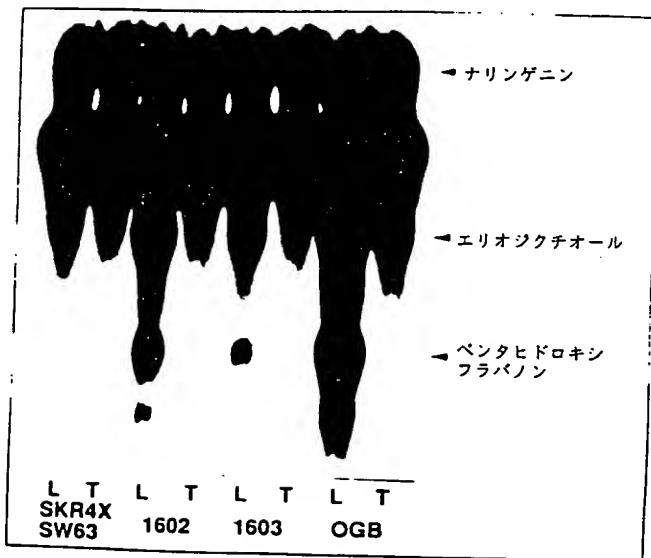


FIG. 15

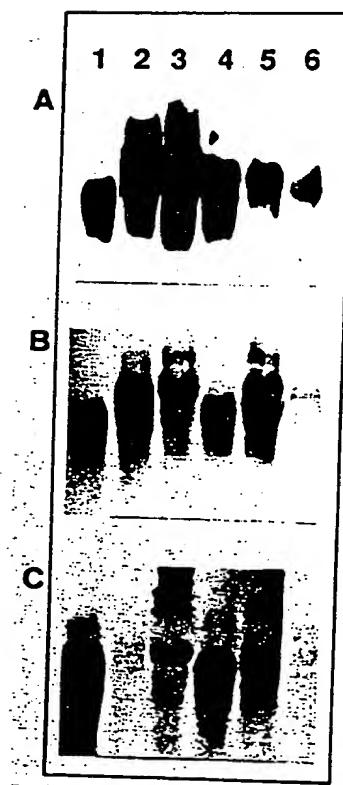


FIGURE 16

国際調査報告

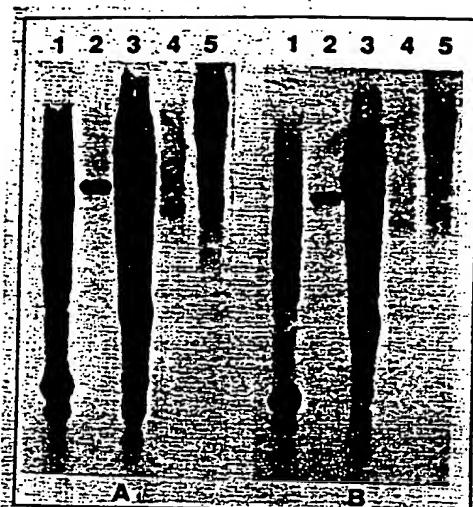
International application No.
PCT/AU92/00334

FIGURE 17

国際調査報告

International application No.
PCT/AU92/00334International application No.
PCT/AU92/00334

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Claims of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
A	Document WPAT Online Abstract Accession no. 90-182380/24 JP,A, 2119777 (MITSUBISHI KASEI CORP) 7 May 1990 Zeitschrift für Naturforschung, Section C, Volume 44, No. 4, 1987 KOCHI et al. "Induction and characterization of a NADPH-dependent flavone-synthase from cell cultures of soybean; conversion of (2S)-erigasterin to epigallocatechin instead of gallocatechin" pp. 343-48 whole article	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet)(July 1992) English

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. CL. 5 C12N 15/51 A01H 5/00	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED	
Minimum documentation searched (classification scheme followed by classification symbols) IPC : C12N, A01H	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched AU : C12N 15/51, A01H 5/00, A01H 5/02	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base, and where practicable, search terms used) DERWENT DATABASE: WPAT, SIOT-KEYWORDS: FLAVONOID, MONOOXYGENASE, HYDROXYLASE, DIHYDROCAMPHEROL, DODYROKAEAMPEROL, P450, COLOUR, PIGMENT, FLOWER, ROSE, PETUNIA, BLUE CHEMICAL ABSTRACTS: CASA-KEYWORDS: FLAVONOID, FLOWER, ROSE, COLOUR, BLUE, HYDROXYLASE, ENZYME	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Claims of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to Claim No.
A	E.P.A. 216797 (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ZUR FORDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 24 May 1989 (24.05.89) entire document
A	A.U.A. 54123/90 (DNA PLANT TECHNOLOGY CORPORATION) 18 October 1990 (18.10.90) entire document
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family chart.	
* Special categories of cited documents : <input checked="" type="checkbox"/> A document defining the general state of the art which is considered to be of particular relevance <input checked="" type="checkbox"/> B A document which may be published on or before the international filing date but which may have been filed earlier than the international filing date and which may therefore deduce priority claim(s) of which it is cited <input checked="" type="checkbox"/> C A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> D A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> E A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> F A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> G A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> H A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> I A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> J A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> K A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> L A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> M A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> N A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> O A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> P A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> Q A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> R A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> S A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> T A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> U A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> V A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> W A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> X A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> Y A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention <input checked="" type="checkbox"/> Z A document which may be published on or before the international filing date and which may relate to the same subject matter as the claimed invention but which is not prior art in accordance with Article 5 of the Convention	
Date of the actual completion of the international search 18 October 1992 (16.10.92)	
Date of mailing of the international search report 30 October 1992 (30.10.92)	
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 2000 WODEN ACT 2606 AUSTRALIA Postcode No. 2613 Telephone No. (06) 2323213	
Authorized officer  M. OSBORNE	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet) (2) (July 1992) English

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item I of first sheet)	
This international search report has not established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reason:	
1. <input type="checkbox"/> Claims No.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> Claims No.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that an meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. <input type="checkbox"/> Claims No.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentence of Rule 16(1).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item II of first sheet)	
This international Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all inseparable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all inseparable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not incur payment of any additional fee.	
3. <input type="checkbox"/> At early stage of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims No.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claim(s) or covered by claims filed:	
Remark on Patent	
<input type="checkbox"/> The additional search fees were compensated by the applicant's patent. <input type="checkbox"/> No patent compensated the payment of additional search fees.	

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet) (1) (July 1992) English

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, N
L, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM
, GA, GN, ML, MR, SN, TD, TG), AT
, AU, BB, BG, BR, CA, CH, CS, DE,
DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, L
K, LU, MG, MN, MW, NL, NO, PL, RO
, RU, SD, SE, US

(72)発明者 コーニッシュ, エドウィナ セシリー
オーストラリア国, ビクトリア 3808, ア
ッパー・ビーコンスフィールド, リードベタ
ー ロード, ロット 33
(72)発明者 コバシク, フィリバ
オーストラリア国, ビクトリア, 3072, ブ
レストラン, カリムナ ストリート 11
(72)発明者 タナカ ヨシカズ
オーストラリア国, ビクトリア 3084, 口
サナ, ベルビュー アベニュー 5/49
(72)発明者 レスター, ディアン ルース
オーストラリア国, タスマニア, 7190, ト
リアブナ, パートン アベニュー 52